農事試驗場歐文報告

第一卷第一號

THE BULLETIN OF THE IMPERIAL CENTRAL AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION JAPAN.

Vol. I. No. 1.

NISHIGAHARA, TOKIO. DECEMBER, 1905.

農事試驗場歐文報告

第一卷第一號

THE BULLETIN OF THE IMPERIAL CENTRAL AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION JAPAN.

Vol. I. No. 1.

NISHIGAHARA, TOKIO. DECEMBER, 1905.

VORREDE.

Im Kaiserreich Japan existieren jetzt im Ganzen 48 selbstständige landwirtschaftliche Versuchs-Stationen, von denen eine durch die Centralregierung, 42 durch Provincialregierungen unter Beihilfe aus der Staatscasse und die übrigen vier vom Adel unterhalten werden. Die unmittelbar der Centralregierung gehörende, d. h. kaiserliche landwirtschaftliche Versuchs-Station besteht aus einer Central-Versuchs-Station, in Nischigahara bei Tokio, und drei unter der Leitung derslben arbeitenden Zweig-Stationen in den Provinzen.

Diese Versuchs-Stationen haben naturgemäss in erster Linie mit Fragen unserer Landwirtschaft sich zu beschäftigen und zwar die kaiserliche Central-Station mehr mit wissenschaftlichen, die provinciellen u. sonstigen Stationen hauptsächlich mit praktischen. Da unsere landwirtschaftlichen Produkte aber nicht nur vielfach andere sind als in Europa, sondern auch die Sumpfkultur[1] eine weit wichtigere Rolle spielt als in den meisten anderen Kulturländern, sind die alljährlichen Berichte unserer Versuchs-Station bisher lediglich in unserer Muttersprache veröffentlicht worden.

Da jedoch manche der erhaltenen Resultate auch für weitere Kreise einiges Interesse haben dürften, hat sich der Unterzeichnete entschlossen, von Zeit zu Zeit ein Bulletin in abendländischen Sprachen, theilweise in

---

1). In Japan nimmt die Reiskultur die erste Stelle ein. Ferner wird Sagittaria wegen der Knollen, Nymphaea wegen der Wurzel und Juncus wegen industrieller Verwendung im Sumpf kultiviert.

deutscher, teilweise in englischer, herauszugeben, worin die von den Beamten unserer Versuchs-Station durchgeführten Arbeiten beschrieben sind.

Die Arbeiten unnser Versuchs-Station sind in folgende Abteilungen gegliedert:

1. Abteilung für Ackerbau.
2. „ „ Agrikulturchemische Untersuchung und Düngerkontrolle.
3. „ „ Pflanzenpathologie.
4. „ „ Landwirtschaftliche Entomologie.
5. „ „ Bodenuntersuchung.
6. „ „ Tierernährung.
7. „ „ Tabakbau.
8. „ „ Theekultur.
9. „ „ Gemüse und Obstbau.

Den Zweig-Stationen sind die Arbeiten dieser Sectionen teilweise zugeteilt und zwar der ersten Zweig-Station bei Osaka (Mittel-Japan) die der ersten Abteilung, der zweiten bei Kumamoto (Südwesten) die der dritten und vierten Abteilungen und der dritten bei Akita (Nordosten) die der sechsten Abteilung.

Prof. Y. Kozai.

Direktor der kaiserlichen landwirtschaftlichen Versuchs-Station.

Tokio, Juni, 1905.

On the Influence of Calcium and Magnesium Salts on Certain Bacterial Actions.

BY

S. MACHIDA.

It is a well known fact that a great excess of lime over the other mineral nutrients can retard the growth of green plants. Further, it has been shown by *Kossowitsch*, that a certain amount of lime compounds can exert a retarding influence upon the humification process, which doubtless is an action of fungi. It was therefore of some interest to observe also the influence of lime compounds on the activity of the microbes causing putrefaction, especially since gypsum is often applied in stables as well as on compost heaps.

On the other hand it was of value to compare the action of calcium salts with those of magnesium salts, which latter are indispensable for the growth of fungi while calcium salts are generally not. Only for the development of Azotobacter the need of lime has been recognised by *Gerlach* and *Vogel* and by *H. Fischer*. These authors also state that denitrification is increased by addition of lime.

In my first experiment the putrefaction of urine was observed[1] under the influence of 0.3% of the following salts:

a.	0.3%	Calcium chlorid.
b.	„	Magnesium chlorid.
c.	„	Sodium chlorid.
d.	„	Monopotassium phosphate.

Three *Erlenmeyer*'s flasks were so connected that a current of air could be passed through them by means of an aspirator. The first contained dilute sulphuric acid to absorb traces of ammonia contained in the air, the second received 300 cc. of fresh urine, the third contained standard sulphuric acid.

1). At the ordinary temperature in the month of May.

The ammonia formed by putrefaction in flask (B) was partly passing into the flask (C) containing standard sulphuric acid and was here determined by titration, partly it remained in the putrefying liquid from which 20 cc. were withdrawn for the determination by *Schlœsing*'s method, taking care to stop further putrefaction of this portion by addition of chloroform. Every determination was carried out twice.

Soon after starting the experiment it was noticed that in the flask with $CaCl_2$ a precipitate was formed. After one week the flask with $MgCl_2$ asaumed a deep brown color, while the other flasks showed this change six days later than the flask with magnesium chloride.

This seemed to indicate that bacterial activity was increased by adding the magnesium salt, but retarded by the calcium salt.

The original urine was found to contain 0.811% nitrogen. The ammonia-nitrogen found in course of the putrefaction process was expressed in percents of the original nitrogen.

I. PERIOD.

After 5 days from start (May 2).

	N of the NH_3 formed, in percent of the original quantity of nitrogen.		
	in the urine.	in the flask containing standard H_2SO_4.	Total.
$CaCl_2$	14.808	—	14.808
$MgCl_2$	20.106	0.016	20.122
NaCl	18.952	0.005	18.957
KH_2PO_4	18.476	0.011	18.487
No addition	19.594	0.007	19.601

II. PERIOD.

After further 5 days (10 days from start).

	N of the NH_3 formed, in percent of the original quantity of nitrogen.					
	in the urine.		in the flask containing standard H_2SO_4.		Total.	
	Newly formed	Since the start.	Newly formed	Since the start	Newly formed	Since the start
$CaCl_2$	8.966	23.774	0.015	0.015	8.981	23.789
$MgCl_2$	54.036	74.142	0.172	0.188	54.208	74.330
NaCl	64.191	83.143	0.148	0.153	67.339	86.296
KH_2PO_4	67.180	85.656	0.136	0.147	67.316	85.803
No addition	36.035	55.629	0.131	0.138	36.166	55.767

III. PERIOD.

After further 10 days (20 days from start).

	N of the NH_3 formed, in percent of the original quantity of nitrogen.					
	in the urine.		in the flask containing standard H_2SO_4.		Total.	
	Newly formed	Since the start	Newly formed	Since the start	Newly formed	Since the start
$CaCl_2$	57.482	81.256	0.086	0.101	57.568	81.357
$MgCl_2$	14.378	88.520	0.521	0.709	14.899	89.229
NaCl	8.465	91.608	0.462	0.615	8.927	92.223
KH_2PO_4	4.717	90.373	0.623	0.770	5.340	91.143
No addition	34.363	89.992	0.734	0.872	35.097	90.864

IV. PERIOD.

After further 5 days (25 days from start).

	N of the NH_3 formed, in percent of original nitrogen.					
	in the urine.		in the flask containing standard H_2SO_4.		Total.	
	Newly formed	Since the start	Newly formed	Since the start	Newly formed	Since the start
$CaCl_2$	11.013	92.269	0.281	0.382	11.294	92.651
$MgCl_2$	—	87.491	0.371	1.080	—	88.571
NaCl	—	87.491	0.346	0.961	—	88.349
KH_2PO_4	—	87.388	0.209	0.979	—	90.632
No addition	—	88.791	0.309	1.181	—	89.972

For the second experiment pepton was selected. The arrangements were the same as in the first experiment: the only difference was that in place of the urine 300 cc. of a two percent pepton solution, were employed containing 0.256%N to which 3 cc. of putrid urine was added for infection. The determination of ammonia in the solution was further made by distillation with magnesia usta. This experiment was carried out at summer temperature, in June. The examination showed, that in this case all ammonia remained in the solution, nothing passed into the standard sulphuric acid. The average results of two trials were as follows:

I. PERIOD.

After 5 days from start, (June 8).

	N of the ammonia formed.	
	in % of pepton-nitrogen.	in % of the original solution.
$CaCl_2$	33.568	0.0860
$MgCl_2$	39.695	0.1017
NaCl	36.144	0.0926
KH_2PO_4	57.211	0.1466
No addition	34.660	0.0888

II. PERIOD.

After further 6 days (June 14).

	N of the ammonia formed.		
	in % of pepton-nitrogen.		in % of the original solution.
	Newly formed	Since the start	Since the start
$CaCl_2$	29.820	63.388	0.1624
$MgCl_2$...	30.445	70.140	0.1797
NaCl	31.764	67.908	0.1739
KH_2PO_4	24.014	81.225	0.2087
No addition	29.235	63.895	0.1637

III. PERIOD.

After further 6 days (June 20).

	N of the ammonia formed.		
	in % of pepton-nitrogen.		in % of the original solution.
	Newly formed	Since the start	Since the start
$CaCl_2$	18.735	82.123	0.2103
$MgCl_2$	21.155	91.295	0.2339
NaCl	19.797	87.705	0.2247
KH_2PO_4	8.861	90.086	0.2308
No addition	19.712	83.607	0.2142

IV. PERIOD.

After further 5 days (June 25).

	N of the ammonia formed.		
	in % of pepton-nitrogen.		in % of the original solution.
	Newly formed.	Since the start	Since the start
$CaCl_2$	6.909	89.032	0.2281
$MgCl_2$	8.237	99.532	0.2550
NaCl	4.332	92.037	0.2358
KH_2PO_4	0.114	90.200	0.2311
No addition	5.500	89.110	0.2283

In the third experiment gypsum and other sulphates were compared as to their influence upon a putrefying medium. Here also served 300 cc. of a two percent pepton solution containing 0.2597% of N, which were kept at the ordinary temperature in the months September and October. The arrangements, treatments and the method of nitrogen determination were the same as in the case of the second experiment. The quantities of the salts added to the pepton solution were as follows:

a. $CaSO_4$ (gypsum unburnt). 0.5%
b. $MgSO_4$ in equivalent amount.
c. Na_2SO_4 „ „
d. No addition.

The percentage amount of gypsum, and molecular equivalents of the other two salts given, relate to the anhydrous state.

One day after the experiment had commenced, the flasks with $MgSO_4$ showed much turbidity and a thick white film indicating a vigorous development of bacteria, while the other three sets only showed a slight turbidity. The average results of two trials are contained in the following tables.

I. PERIOD.

After 5 days from the start (Sept. 20).

	N of the ammonia formed.	
	in % of pepton nitrogen.	in % of the original solution.
$CaSO_4$	32.308	0.0840
$MgSO_4$	36.961	0.0961
Na_2SO_4	29.769	0.0774
No addition	30.077	0.0782

II. PERIOD.

After further 5 days (Sept. 25).

	N of the ammonia formed.		
	in % of pepton nitrogen.		in % of the original solution.
	Newly formed	Since the start	Since the start
$CaSO_4$...	24.769	57.077	0.1484
$MgSO_4$	26.116	63.077	0.1640
Na_2SO_4	31.308	61.077	0.1588
No addition	25.269	55.346	0.1439

III. PERIOD.

After further 10 days (Oct. 5).

	N of the ammonia formed.		
	in % of pepton nitrogen.		in % of the original solution.
	Newly formed	Since the start	Since the start
$CaSO_4$...	16.461	73.538	0.1912
$MgSO_4$	15.961	79.038	0.2055
Na_2SO_4	18.192	79.269	0.2061
No addition	16.577	71.923	0.1870

IV. PERIOD.

After further 10 days (Oct. 15).

	N of the ammonia formed.		
	in % of pepton nitrogen.		in % of the original solution.
	Newly formed	Since the start	Since the start
$CaSO_4$	6.923	80.461	0.2092
$MgSO_4$	—	79.038	0.2055
Na_2SO_4	2.269	81.538	0.2120
No addition	3.115	75.038	0.1951

It will be seen from these results that magnesium chlorid had some favorable action upon the process of putrefaction, while calcium chlorid had not. Calcium chlorid showed especially in the case of putrifying urine a considerable retarding action, which was naturally not more so striking toward the end of the putrefaction.

Calcium sulphate did not act upon the putrifying process, probably on account of its low solubility; magnesium sulphate promoted the putrifying activity only in the beginning. Sodium salts seem to act favorably upon the progress of putrefaction, but the influence is not so marked as with magnesium salts.

In the fourth experiment tricalcium phosphate and sodium phosphate were compared, in which the following solutions (200 cc.) were used.

	a	b
Asparagin	1.00%	1.00%
Cane sugar	1.00 „	1.00 „
K_2SO_4	0.20 „	0.20 „
$MgSO_4$	0.01 „	0.01 „
$Ca_3(PO_4)_2$	0.20 „	—
Na_2HPO_4	—	molecular equivalent to $Ca_3(PO_4)_2$

These solutions were after sterilization infected respectively with B. fluorescens liquefaciens, Proteus vulgaris, and B. mycoides. For comparison

served the infection with one drop of putrid urine. The infected solutions were kept at the ordinary temperature from Sept. 15 to Oct. 5. The ammoniacal nitrogen was determined by distilling 20cc. of the solution with magnesia usta. The results were after 2 weeks standing as follows:

	N of the ammonia formed.	
	In % of the original solution (average of two determ.).	
	$Ca_3(PO_4)_2$	Na_2HPO_4
B. fluorescens liq.	0.100	0.120
Proteus vulgaris	0 090	0.130
B. mycoides	0.060	0.060
Urine	0.120	0.100
Average	0.1925	0.1025

From this experiment it will be seen that in both cases the phosphoric acid was assimilated by the bacteria nearly to the same extent. It is probable however that there is previously formed some magnesium phosphate from both the phosphates applied. The behavior of bacteria towards insoluble phosphates in the soil is also from the practical standpoint an interesting problem.

Another important subject in this line is the influence of various salts upon the loss of nitrogen, because a favorable condition of putrefaction frequently also favors denitrification. 200 grms. of sifted soil were well mixed with 0.3% of the salts above mentioned and 20 grms. of powdered soy bean cake, as the source of nitrogen. The mixture was placed in a conical flask arranged just in the same way as in the foregoing experiments.

After standing for 64 days (from April 7 to June 10) at the ordinary temperature, the nitrogen was determined with the following result:

1. Total amount of N contained in each flask before the experiment.

		in grms.
Organic nitrogen	in soil.	0.572
	in oil cake.	1.403
Ammoniacal nitrogen	in soil.	0.004
Nitric nitrogen	„ „	0.010
Total		1.989

II. Total amout of N contained in the flasks after the experiment.

	Organic N, g.	Ammonia N, g.		Nitric N, g.	Total.
		in soll	in standard H_2SO_4		
$CaCl_2$	1.895	0.052	0.002	0.044	2.083
$MgCl_2$	1 981	0.039	0.002	0.039	2.077
NaCl	2.144	0.070	0.003	0.050	2.267
K_2HPO_4	1.997	0.053	0.010	0.026	2.070
No addition	1.985	0.065	0.003	0 037	2.000

From the above figures it will be seen that none of the salts added favored denitrification. On the contrary a very small gain of nitrogen was observed, probably due to certain bacteria capable of assimilating free nitrogen. The results might however have differed after a special infection with a large amount of denitrifying microbes.

It was in this connection also of interest to compare the effects of lime and magnesia salts on the nitrifying process.

It was already found by *Wagner* that an addition of carbonate of lime especially to humus soil acts very favorably on the nitrification.[1] It was further observed that application of lime especially on heavy loam soil enhances all bacterial activities in the soil. But thus far no comparison was made of this effect of lime with that of magnesia. My observation that magnesia enhances putrefaction much more so than lime made it very probable that this would also be so with the nitrifying bacteria.

According to *Warington*[2] gypsum favors nitrification in putrid urine. Hereby however gypsum is transformed into carbonate. He also stated that small quantities of alkali carbonate (0.368 grms. per liter) also ammonium carbonate stops the nitrification process what has been comfirmed by *Chuard*.

1). *Polzeniusz* (1898) observed that it is chiefly the lime in the form of carbonate which favors nitrification of the soil, in all those cases in which the nitrogen is applied as ammonium sulphate.

2). I. B. Agr. Chem, 1886.

Pichard[1] states that gypsum acts favorably on nitrification in porous soils, but in other soils reduction to sulphide by bacterial activity might result which would injure the nitrification process.

According to *Wagner* the most favorable case was, when he applied 5 grms. marl upon 300 grms. of soil. Thus 90 parts of nitrate nitrogen were obtained from each 100 parts of ammoniacal nitrogen in the nitrifying process. He applied for 300 grms. soil only 0.1 nitrogen (=0.471 grms. ammonium sulphate) and observed a very much quicker action in the warm house than at the ordinary temperature. He used a small glass flask 6.5 cm. wide and 17 cm. high and every 12 days he transfered the contents of 2 parallel flasks in liter flasks, each was filled up to the mark with distilled water and after shaking repeatedly he determined in the filtrate the nitric acid which was apparently carried out after *Schultze-Tiemann*. According to the above principle I have arranged my experiment in the following way:

Two glass cylinders of about 1 liter capacity were filled with 1 kilogram of fine quartz sand with an addition of 20 grms. of garden soil and to one of which 1 grm. of calcium carbonate and to another 1 grm. of magnesium carbonate were added; both cylinders were then moistened and mixed thoroughly with 200cc. of a solution containing 0.5 grm. ammonium sulphate, 0.1 grm. potassium phosphate, and 0.01 grm. magnesium sulphate. The mixtures were kept in a moist incubator 25°C. After two weeks a portion of the mixture was taken from both cylinders and thoroughly dried. 100 grms of the dry mixture were extracted with 100cc. of cold distilled water for 24 hours with frequent shaking; then filtered, washed, and the filtrate filled to 1 liter. The diphenylamine test at that time was positive with the magnesia mixture but failed with the lime mixture. After 4 weeks again the qualitative test was made and now the limed sample gave a moderate blue coloration but the sample containing magnesia yielded a much more intense reaction.

These comparative colorimetric tests prove that magnesium carbonate favors nitrification much more than calcium carbonate does.

The results of my investigation may be summarized as follows:

1). I. B. Agr. Chem. 1892.

I. Calcium salts retard putrefaction of certain materials.[1] On the contrary, magnesium salts favor putrefaction.

II. It is an interesting fact that tricalcium phosphate can be utilized by some putrefying bacteria, proving that in the soil insoluble phosphates can probably be transformed into an available form.

III. Magnesium carbonate favors nitrification much more than calcium carbonate, of which practical use might be made in certain cases.

---

1). After these investigations had been finished, a report by *Hals* appeared in the Centralblatt für Agriculturchemie Febr. 1905, which stated that the putrefaction of urine can be prevented by 2% freshly slaked lime. Here however it was a strong base that acted, while our observations relate to neutral salts.

Correction of a Very Unfavorable Ratio of Lime to Magnesia in a Soil for the Culture of Barley.

BY

G. DAIKUHARA.

It has been shown by the experiments of *Loew* and *May*,[1] *Asō*, *Furuta*, *Katayama* and the author[2] that under otherwise favorable conditions a maximum harvest will only be obtained when the amounts of lime and magnesia bear a certain ratio to each other. For most of Gramineae this ratio was found to be $\frac{CaO}{MgO} = 1$ or nearly so, while for other plant especially those which develop more foliage in a given time than the Gramineae, two or more times CaO than MgO is required. Hence it is of interest to determine the available amounts of CaO and MgO in the soil to correct the existing ratio by addition of suitable lime or magnesia-compounds when the difference between these bases is considerable. When this difference does not exceed 0.5 and the lime content is at the same time sufficient, a correction can not be expected to exert an essential influence. Thus some experiments were made by the author with soils showing but small differences in the percentage of these two bases[3] namely:

	CaO.	MgO.
Soil from Kinai	0.44	0 40
„ „ Sendai	0 96	0.71
„ „ Hokuriku	0.55	0.79
„ „ Sanyō	0 42	0.58
„ „ Shikoku...	1.70	1.76
„ „ Sanin	0.46	0.53
„ „ Tokyo	1.06	1.40
„ „ Tōkai	0.44	0.45

1). Bulletin No. 1. of the Bureau of Plant Industry 1901, Washington.

2). Bulletins of the College of Agriculture, Tokio Imperial University, Vol. IV., V. and VI.

3). These determinations were made with the hot HCl-extract of the fine earth.

The results agreed with the expectation. The yield of naked barley was not essentially altered when the amounts of these bases were rendered equal by adding $CaCO_3$ or $MgCO_3$. However a very essential increase of yield is to be expected by correcting the ratio when the differences are much larger. Such a soil occurs e.g. at Ōmagari in the province of Ugo. The analysis showed CaO=0.64% MgO=1.91%. Therefore, difference =1.27 and the ratio $\frac{CaO}{MgO}=\frac{0.34}{1}$. This ratio would be very unfavorable for barley and, in accordance with the theory, correction of this ratio, making the amounts equal, yielded a very considerable increase of harvest. This soil was an alluvial humous soil.

The pots used in this experiment contained 10 81 kilo soil. and, in liming, this received 245 gr. precipitated $CaCO_3$. Two pots served in each case The general manure was :

	Gr. p. pot.	Ratio p. hectar.
Ammonium nitrate	1.71	342 kilo=112.5 kilo. N.
Sodium phosphate	1.90	380 „ = 75.0 „ P_2O_5.
Potassium carbonate	0.61	122 „ = 75.0 „ K_2O.

In order to attain a proper valuation of that soil, further control tests were made, two pairs of pots not receiving any manure at all, two other pairs no potassa, and two further pairs no nitrogen.

Nine seeds of naked barley (variety *osome*) were sown Nov. 24 [1903] and the young plants, when 10—12 cm. high, reduced to 5 of equal size in all the twenty pots. All conditions were kept as equal as possible.

The average height of the 5 plants in each pot and the average number of stalks were as follows :

Manures applied.	Kind of soil.	No. of Pots.	Height of Plants. April 20.	Aver.	Height of Plants. May 31.	Aver.	Number of Stalks. May 31.	Aver.
General manure.	Original soil	1.	30.6 cm.	24.6 cm.	52.8 cm.	52.7 cm.	11	9
		2.	18.6 „		52.5 „		6	
	Limefactor corrected	1.	28.8 „	33.3 cm.	57.9 „	56.7 cm.	11	13
		2.	37.8 „		55.5 „		14	

Manures applied	Kind of soil.	No. of Pots.	Height of Plants. April 20.	Aver.	Height of Plants. May 31.	Aver.	Number of Stalks May 31.	Aver.
No N	Original soil	1.	27.3 cm.	24.9 cm.	45.0 cm.	45.8 cm.	6	6
		2.	22.5 „		46.5 „		5	
	Limefactor corrected	1.	36.3 „	36.2 cm.	57.6 „	54.3 cm.	9	9
		2.	36.0 „		50.7 „		8	
No K_2O	Original soil	1.	26.4 „	18.3 cm.	49.2 „	38.4 cm.	9	7
		2.	10.2 „		27.6 „		4	
	Limefactor coerrcted	1.	38.1 „	37.8 cm.	59.6 „	63.6 cm.	14	15
		2.	37.5 „		67.5 „		15	
No manure	Original soil	1.	20.4 „	—	39.6 „	—	7	—
		2.	— „		— „		—	
	Limefactor corrected	1.	26.7 „	28.8 cm.	59.4 „	56.0 cm.	10	10
		2.	30.9 „		52.5 „		9	

The plants were photographed before flowering; these photographs, reprodused on Plate I show very plainly the considerable difference of development. The plants were cut on May 31 with the following result.

Manures applied.	Kind of soil.	No. of Pots.	Grain. Gr.	Aver.	Chaff. Gr.	Aver.	Straw. Gr.	Aver.	Total. Gr.	Aver.
General manure	Original soil	1.	8.45	6.24	—	2.07	14.57	12.22	—	20.53
		2.	4.22		2.07		9.87		16.16	
	Limefactor corrected	1.	12.88	14.56	4.74	5.01	20.30	21.85	34.92	41.41
		2.	16.23		5.27		23.40		44.90	
No N	Original soil	1.	2.94	2.30	0.94	0.79	4.24	4.49	8.12	7.58
		2.	1.65		0.64		4.74		7.03	
	Limefactor corrected	1.	13.31	12.47	4.18	4.05	17.00	16.00	34.49	32.51
		2.	11.62		3.91		14.99		30.52	

Manures applied.	Kind of soil.	No. of Pots.	Grain. Gr.	Aver.	Chaff. Gr.	Aver.	Straw. Gr.	Aver.	Total. Gr.	Aver.
No K_2O	Original[1] soil	1.	10.44	—	4.24	—	14.03	—	28.71	—
		2.	—		—		—		—	
	Limefactor corrected	1.	17.99	18.84	5.42	5.66	26.40	25.84	49.81	50.33
		2.	19.68		5.89		25.27		50.84	
No manure	Original[1] soil	1.	4.19	—	1.47	—	4.59	—	10.25	—
		2.	—		—		—		—	
	Limefactor corrected	1.	11.81	13.68	3.89	4.17	14.68	15.39	30.36	33.22
		2.	15.54		4.44		16.09		36.07	

The result shows that on this well manured soil, which contained originally the very unfavorale ratio $\frac{CaO}{MgO} = \frac{0.34}{1}$, the harvest was doubled by procuring the proper limefactor, and further that the beneficial effect of liming that soil became even more evident when the manuring was one-sided or did not take place at all.[2] The effect of liming upon the growth of the plant depends, however, not only upon the regulation of the ratio of lime to magnesia but also upon the improvement of the physical and chemical conditions of the soil. To what extent the various actions of liming play a part in the increased production of the plant will be ascertained by future experiments.

1). In some of the pots the plants were damaged by cold and parasites and were therefore disregarded.

2). The ratio CaO : MgO in soils is generally disregarded, hence, the results obtained by liming appear often mysterious to the experimenters. Thus *Prijanishnikow* described recently (Biedermanns Centralblatt 1904, p. 442) some experiments with soils, in which he did not pay attention to the ratio CaO : MgO. The harvest in vetches showed there after liming on one soil an increase, on the other a decreae. Further one soil on addition of 1% CaO yielded an increase in lupines, on another a decrease.

Original soil.

No manure. N.P. P.K. N.P.K.

Lime-factor corrected.

No manure. N.P. P.K. N.P.K.

On the Lime Factor for the Tobacco Plant.

BY

G. DAIKUHARA.

In order to determine the best ratio of lime to magnesia for the tobacco plant, a soil limed in different degrees should be observed. From former experiments with other plants rich in foliage it can hardly be expected that the lime-factor would be much higher than 4. This becomes also probable from tne comparisons of the ashes of various kinds of tobacco.

Ash of	CaO	MgO	CaO : MgO
Virginia tobacco	31.12	8.58	3.63 : 1
Kentucky „	35.35	9.35	3.78 : 1
Hungarian „	27.10	6.10	4.44 : 1
German „	39.53	9.61	4.11 : 1
In average	33.28	8.41	3.96 : 1

The ratio in Massachussets tobaccos was found by Smith also very nearly 4 : 1. Since tobacco is a highly valuable crop in our country it is important to test the soils whether they contain the most beneficial ratio of CaO : MgO.

I have applied in my experiment[1] three different ratios of CaO to MgO viz. $\frac{CaO}{MgO} : \frac{1}{1} : \frac{2}{1}$ and $\frac{4}{1}$.

The original soil contained nearly the same quantities of equally available CaO and MgO, viz. CaO = 0.27% and MgO = 0.25[2] and the lime applied for procuring the other ratios was air slaked lime which contained CaO 66.88% and MgO 0.75. This lime was mixed with the soil long before the manure was applied in order to have it completely transformed into carbonate.

---

1) This experiment was performed on our experimental field at Ota in the province of Hitachi.

2) These quantities were determined after Ulbricht's method modified by Katayama, Bulletin of the College of Agriculture, Tokyo, Vol. VI. No. 2.

The manure was supplied at the following ratio :

N as ammonium sulphate ... ... 112.5 kilo. N p. hectar,
P_2O_5 as superphosphate ... ... 75.0 „ P_2O_5 „ „ „
K_2O as potassium carbonate ... ... 112.5 „ K_2O „ „ „

P_2O_5 and K_2O were applied in one dose, June 3, and the N in three doses, June 3, 9 and 17.

51 wooden frames served for the experiment. They were placed in the soil, having an area of 9 square feet, three frames serving for each trial.

On May 28 four young tobacco plants (variety *kokubu*, Mito) were transplanted from the seed bed into the frames.

The plants developed normally and were harvested on August 29 except the sand leaves (Aug. 3). The results obtained from the main frames with different lime-factors are seen from the following tables which show very clearly that the best result was obtained with the lime-factor 4 :

TABLE I.

	Budding.	Flowering.	Topping.
Lime-factor 1 (Original soil)	Aug. 5	Aug. 10	Aug. 13
„ 2	Jul. 24	„ 3	„ 10
„ 4	„ 23	„ 1	„ 10

TABLE II.[1]

	Stalk		Leaf			
	Length.	Circumference.	Length.	Breadth.	Number.	Length of Petiole.
Lime-factor 1 (Original Soil)	146.4 c.m.	9.9 c.m.	42.6 c.m.	30.3 c.m.	24	4.5 c.m.
„ 2	164.1 „	9.9 „	45.0 „	31.5 „	24	4.2 „
„ 4	171.0 „	10.2 „	50.1 „	35.1 „	24	4.8 „

TABLE III.[2]

	Leaf and stalk. (fresh).	Leaf. (air dried).	Stump and root. (air dried).
Limefactor 1 (Original soil)	1004.6 gr.	85.1 gr.	61.1 gr.
„ 2	1206.4 „	101.3 „	79.5 „
„ 4	1438.5 „	106.2 „	93.8 „

1) Three normally developed plants were selected at the time of harvest and measured.

2) This represents the average number of three parallel experiments.

Futher experiments were performed with the soil which was only supplied with partial manures. The observations made during these experiments are contained in the following tables.

TABLE IV.

Manures applied.	Kind of soils.	Budding.	Flowering.	Topping.
No Manure	Original soil	Aug. 12	Aug. 19	Aug. 23
	Limefactor 4	Jul. 28	„ 10	„ 10
N, P_2O_5, K_2O	Original soil	Aug. 5	„ 10	„ 13
	Limefactor 4	Jul. 23	„ 1	„ 10
N	Original soli	Aug. 3	„ 13	„ 16
	Limefactor 4	Jul. 24	„ 8	„ 10
P_2O_5	Original soil	Aug. 10	„ 17	„ 19
	Limefactor 4	Jul. 28	„ 9	„ 10
K_2O	Original soil	Aug. 10	„ 19	„ 23
	Limefactor 4	Jul. 28	„ 10	„ 13
N, P_2O_5	Original soil	Aug. 5	„ 10	„ 10
	Limefactor 4	Jul. 28	„ 5	„ 13
N, K_2O	Original soil	Aug. 2	„ 14	„ 19
	Limefacter 4	„ 1	„ 11	„ 16
P_2O_5, K_2O	Original soil	„ 8	„ 16	„ 19
	Limefactor 4	Jul. 28	„ 10	„ 13

The effect of liming upon the growth of the plants was, as seen in Plate II, very remarkable.

TABLE V.[1]

Manures applied.	Kind of soils.	Stalk		Leaf			Length of Petiole.
		Length.	Circumference.	Length.	Breadth.	Number.	
No manure	Original soil	128.7 c.m.	7.2 c.m.	37.8 c.m.	24.0 c.m.	23	4.2 c.m.
	Limefactor 4	152.6 „	9.0 „	43.8 „	26.7 „	26	5.7 „
N, P_2O_5, K_2O	Original soil	146.4 „	9.9 „	4.26 „	30.3 „	24	4.5 „
	Limefactor 4	171.0 „	10.2 „	50.1 „	35.1 „	24	4.8 „
N	Original soil	138.6 „	8.7 „	40.8 „	28.2 „	23	5.1 „
	Limefactor 4	178.2 „	9.9 „	47.7 „	32.1 „	23	5.1 „
P_2O_5	Original soil	126.3 „	7.5 „	34.2 „	23.7 „	27	4.2 „
	Limefactor 4	167.4 „	10.2 „	48.3 „	31.2 „	24	5.4 „
K_2O	Original soil	127.2 „	7.2 „	35.1 „	23.1 „	27	4.5 „
	Limefactor 4	155.4 „	9.3 „	43.5 „	29.7 „	27	5.4 „
N, P_2O_5	Original soil	155.4 „	9.6 „	42.9 „	30.3 „	26	5.1 „
	Limefactor 4	158.4 „	9.3 „	42.9 „	29.7 „	25	4.8 „
N, K_2O	Original soil	140.7 „	8.7 „	43.5 „	29.1 „	24	5.1 „
	Limefactor 4	143.1 „	8.7 „	42.0 „	27.9 „	24	4.8 „
P_2O_5, K_2O	Original soil	135.0 „	8.1 „	39.3 „	25.8 „	25	4.5 „
	Limefactor 4	165.6 „	9.3 „	43.2 „	27.6 „	27	5.4 „

The plants were harvested also on August 29 with the following results (average of 3 parallel experiments).

1) Three normally developed plants were selected and measured.

TABLE VI.

Manures applied.	Kind of soils.	Weights		
		Total. (in the fresh state.)	Leaf. (air dried).	Stump and root. (air dried)
No manure	Original soil	647.6 gr.	53.7 gr.	30.4 gr.
	Limefactor 4	1211.6 „	88.2 „	75.4 „
N, P_2O_5, K_2O	Original soil	1004.6 „	85.1 „	61.1 „
	Limefactor 4	1438.5 „	106.2 „	93.8 „
N	Original soil	853.2 „	77.7 „	56.3 „
	Limefactor 4	1271.6 „	100.5 „	82.9 „
P_2O_5	Original soil	665.3 „	58.1 „	31.9 „
	Limefactor 4	1248.0 „	94.1 „	80.3 „
K_2O	Original soil	603.8 „	48.9 „	24.8 „
	Limefactor 4	1133.7 „	93.8 „	66.8 „
N, P_2O_5	Original soil	1127.3 „	85.2 „	62.3 „
	Limefactor 4	1042.9 „	84.4 „	55.5 „ 1)
N, K_2O	Original soil	853.9 „	68.3 „	43.5 „
	Limefactor 4	894.8 „	76.9 „	49.1 „
P_2O_5, K_2O	Original soil	748.1 „	67.5 „	36.0 „
	Limefactor 4	1067.3 „	84.8 „	60.0 „

The weights of the different kinds of leaves sorted according to their positions are shown in the following table.

1) In these frames a red spot disease was noticed.

TABLE VII.

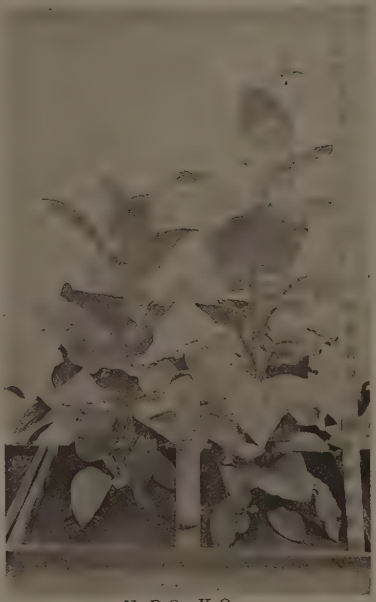
Manures applied.	Kind of soils.	Weight of Leaves air dried					Comparison, (original soil =100).
		Sand Leaves.	Middle Leaves.	Main Leaves.	Tip Leaves.	Total	
No manure	Original soil.	3.8 gr.	9.0 gr.	30.4 gr.	10.5 gr.	53.7 gr.	100
	Limefactor 4	6.8 „	18.0 „	47.3 „	16.1 „	88.2 „	164
N, P_2O_5, K_2O	Original soil.	7.1 „	16.1 „	46.5 „	15.4 „	85.1 „	100
	Limefactor 2.	8.6 „	21.8 „	57.0 „	13.9 „	101.3 „	119
	Limefactor 4.	9.4 „	20.3 „	60.4 „	16.1 „	106.2 „	125
N	Original soil.	5.3 „	13.1 „	48.0 „	11.3 „	77.7 „	100
	Limefactor 4.	8.6 „	17.3 „	57.0 „	17.6 „	100.5 „	128
P_2O_5	Original soil.	4.1 „	10.1 „	34.5 „	9.4 „	58.1 „	100
	Limefactor 4.	6.4 „	19.9 „	52.5 „	15.3 „	94.1 „	162
K_2O	Original soil.	3.8 „	8.3 „	29.3 „	7.5 „	48.9 „	100
	Limefactor 4.	7.5 „	18.0 „	54.0 „	14.3 „	93.8 „	193
N, P_2O_5	Original soil.	7.9 „	15.0 „	48.4 „	13.9 „	85.2 „	100
	Limefactor 4.	8.6 „	19.1 „	42.4 „	14.3 „	84.4 „	99[1]
N, K_2O	Original soil.	5.3 „	11.6 „	40.5 „	10.9 „	68.3 „	100
	Limefactor 4.	8.6 „	15.0 „	39.8 „	13.5 „	76.9 „	113
P_2O_5, K_2O	Original soil.	4.9 „	11.6 „	40.1 „	10.9 „	67.5 „	100
	Limefactor 4.	7.1 „	15.0 „	49.9 „	12.8 „	84.8 „	126

The results obtained in all of the experiments show unanimously that the liming of the soil has a good effect upon the growth of the tobacco pltant. To what extent the regulation of the ratio of lime to magnsia contributes to the increased yield of the tobacco plant will, as stated above be ascertained by future experiments.

(1 As already mentioned a red spot disease appeared in these frames.

Original soil.

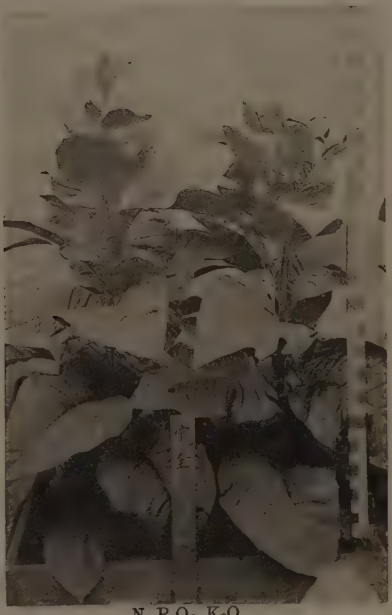
No manure.



N, P_2O_5, K_2O.

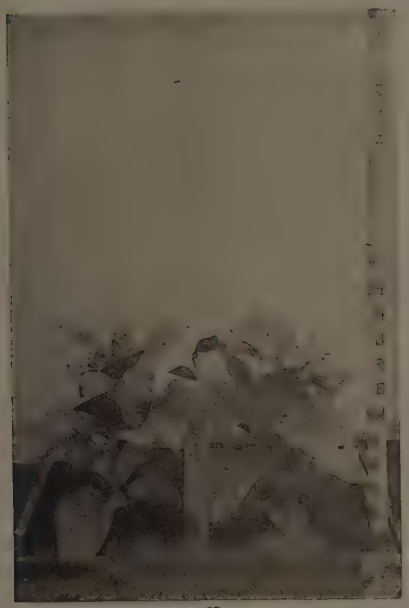
Lime-factor corrected.

No manure.

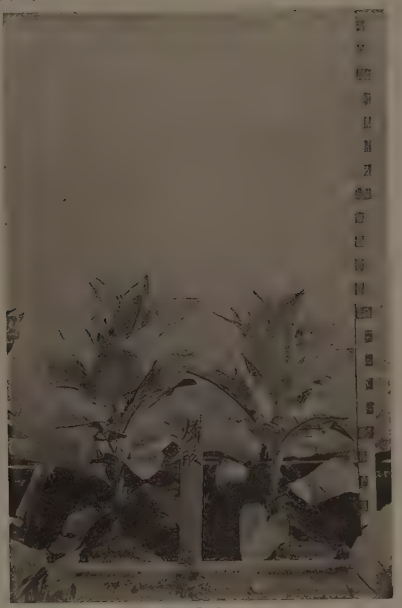


N, P_2O_5, K_2O.

Original soil.



N.



P_2O_5.

Lime-factor corrected.

N.

P_2O_5.

Original soil.

K_2O.

Lime-factor corrected.

K_2O.

On the Application of Magnesia in the Form of Magnesium Sulphate for the Needs of the Rice Plant.

BY

G. DAIKUHARA.

The question how to provide a soil, very rich in lime and relatively poor in magnesia, with the necessary amount of magnesia is of practical importance. Since there occur no large deposits of magnesite in Japan and further since dolomite contains too much lime for our purpose, there remains as a chief material only the sulphate of magnesia. This salt, however, furnishes the magnesia in a highly available form, while the original lime compounds in the soil are generally not so easily available, hence the quantity of magnesium sulphate ($MgSO_4 . 7H_2O$) to be applied muct be relatively small and carefully regulated in order to provide the plant with the most favorable ratio of CaO and MgO. Let us suppose a given soil contains 1% of lime in form of carbonate, then 1% of magnesia in form of magnesite must be added in order to reach the best ratio for rice or related cereals. But in applying magnesia as a sulphate much less will be required to produce the same beneficial effect, and a further increase would prove very injurious. It is now the question what amount of magnesia as sulphate would be required for a given soil to produce the maximum harvest. Since no suitable soil was at hand, an experiment with sand culture was made.

Quartz sand, after treating with dilute HCl (2%) and careful washing with water, was mixed with 1% of lime as carbonate, while the magnesia was applied as sulphate in the following proportions :

No. of Pot.	CaO : MgO	$CaCO_3$ added.		$MgSO_4 . 7 H_2O$ added.	
		Larger pots.	Smaller pots.	Larger pots.	Smallor pots.
1.	5 : 1	80.4 gr.	30.4 gr.	54.96 gr.	20.77 gr.
2.	10 : 1	,,	,,	27.48 ,,	10.39 ,,
3.	20 : 1	,,	,,	13.74 ,,	5.19 ,,
4.	30 : 1	,,	,,	9.16 ,,	3.46 ,,
5.	40 : 1	,,	,,	9.87 ,,	2.60 ,,
6.	50 : 1	,,	,,	5.50 ,,	2.08 ,,
7.	60 : 1	,,	,,	4.58 ,,	1.73 ,,

28 glass pots served for this experiment, half of which contained 4.5 kilo. sand, while the other half held only 1.7 kilo. To the 14 larger pots 2 grms. of sodium nitrate were applied as nitrogenous manure, to the 14 smaller pots the same quantity of nitrogen in the form of ammonium sulphate. To all these pots so much mono-potassium phosphate was applied that the ratio $N : P_2O_5 = 2 : 1$ was attained.

As potassa manure 2 gr. potassium sulphate served per pot. Traces of ferrous sulphate and some sodium silicate were also added.

9 seeds of rice (variety *sekitori*) were sown June 8, 1904, in the 14 larger pots and afterward the young plants reduced to 5 of equal size for each pot. In the smaller pots five young plants about 30 cm. high of the same variety of rice were planted July 1. All the pots were kept in a glass house.

The height of plants and the number of stalks measured July 26 are seen in the following table :

I. Manured with sodium nitrate.

No. of Pot.	CaO : MgO	Height of plants. cm.	Number of stalks.	Average per pot.	
				Height of Plants. cm.	Number of stalks.
1.	5 : 1 { Pot 1.	34.5	5	34.5	5.0
	„ 2.	—	—1)		
2.	10 : 1 { Pot 1.	54.0	7	51.8	6.5
	„ 2.	49.5	6		
3.	20 : 1 { Pot 1.	53.1	6	54.6	6.5
	„ 2.	56.1	8		
4.	30 : 1 { Pot 1.	60.3	7	58.8	6.5
	„ 2.	57.3	6		
5.	40 : 1 { Pot 1.	51.6	5	53.0	6.5
	„ 2.	54.3	8		
6.	50 : 1 { Pot 1.	63.9	9	60.3	8.0
	„ 2.	56.7	7		
7.	60 : 1 { Pot 1.	55.5	6	54.8	7.5
	„ 2.	54.0	9		

II. Manured with ammonium sulphate.

No. of Pot.	CaO : MgO	Height of plants. cm.	Number of stalks.	Average per pot.	
				Height of plants. cm.	Number of stalks.
1.	5 : 1 { Pot 1.	24.6	4	25.8	4.0
	„ 2.	27.0	4		
2.	10 : 1 { Pot 1.	41.1	7	38.9	7.5
	„ 2.	36.6	8		

1) Plants in this pot died off in the middle of July.

No. of Pot.	CaO : MgO	Height of plants. cm.	Number of stalks.	Average per pot.	
				Height of plants. cm.	Number of stalks.
3.	20 : 1 { Pot 1.	40.2	13	39 6	11.5
	„ 2.	39.0	10		
4.	30 : 1 { Pot 1.	43.2	8	43.7	8.5
	„ 2.	44.1	9		
5.	40 : 1 { Pot 1.	43.2	7	42.6	6.5
	„ 2.	42.0	6		
6.	50 : 1 { Pot 1.	37.8	12	43.1	11.5
	„ 2.	48.3	11		
7.	60 : 1 { Pot 1.	42.9	8	42.5	8.5
	„ 2.	42.0	9		

The difference in the development of the plants became, as seen in Plate III, very marked. On Oct. 22 the plants were cut, except No. 1 which was harvested Oct. 29 and, after becoming air dry, weighed. The stumps and roots were well washed with water, dried and weighed also. The results are shown in the following tables :

I. Manured with sodium nitrate.

No. of Pot.	CaO : MgO	Seeds. gr.	Stalks. gr.	Stumps and roots. gr.	Average per pot.			
					Seeds. gr.	Stalks. gr.	Stumps and roots gr.	Total. gr.
1.	5 : 1 { Pot 1.	0.9	4.4	1.1	0.9	4.4	1.1	6.9
	„ 2.	—	—	—				
2.	10 : 1 { Pot 1.	4.8	6.2	4.2	4.1	5.9	2.1	12.1
	„ 2.	3.3	5.6					
3.	20 : 1 { Pot 1.	3.5	5.6	4.6	4.2	6.1	2.3	12.6
	„ 2.	4.8	6.5					

No. of Pot.	CaO : MgO	Seeds. gr.	Stalks. gr.	Stumps and roots. gr.	Average per pot. Seeds. gr.	Stalks. gr.	Stumps and roots. gr.	Total. gr.
4.	30 : 1 Pot 1.	5.3	8.0	7.0	5.1	7.1	3.5	15.7
	„ 2.	4.9	6.1					
5.	40 : 1 Pot 1.	3.3	4.7	5.0	4.1	5.6	2.5	12.2
	„ 2.	4.9	6.4					
6.	50 : 1 Pot 1.	5.5	7.2	6.0	5.4	7.1	3.0	15.5
	„ 2.	5.2	6.9					
7.	60 : 1 Pot 1.	5.1	6.7	5.4	5.1	6.7	2.7	14.5
	„ 2.	5.1	6.7					

II. Manured with ammonium sulphate.

No. of Pot.	CaO : MgO	Seeds. gr.	Stalks. gr.	Stumps and roots. gr.	Average per pot. Seeds. gr.	Stalks. gr.	Stumps and roots gr.	Total. gr.
1.	5 : 1 Pot 1.	0.9	5.7	1.9	1.4	7.2	1.0	9.6
	„ 2.	1.9	8.7					
2.	10 : 1 Pot 1.	8.7	12.7	6.2	8.2	12.9	3.1	24.2
	„ 2.	7.7	13.1					
3.	20 : 1 Pot 1.	15.2	16.5	7.1	14.3	16.1	3.6	34.0
	„ 2.	13.4	15.6					
4.	30 : 1 Pot 1.	13.8	17.8	10.6	14.2	18.2	5.3	37.7
	„ 2.	14.6	18.5					
5.	40 : 1 Pot 1.	13.1	17.3	8.4	12.5	17.0	4.2	33.7
	„ 2.	11.9	16.7					
6.	50 : 1 Pot 1.	12.5	16.7	8.7	13.0	17.6	4.4	35.0
	„ 2.	13.5	18.5					
7.	60 : 1 Pot 1.	13.0	15.4	7.6	10.9	14.6	3.8	29.3
	„ 2.	8.8	13.8					

These tables show that in the presence of lime as carbonate the necessary amount of magnesia when applied as crystallized sulphate for paddy rice in sand culture is so small that the best ratio CaO : MgO becomes 30 : 1, while in the form of natural carbonates the best ratio would be 1 : 1 as Aso[1] had ascertained. This conclusion will hold good also for various sandy soils, while for clayey soils the best ratio $\frac{\text{CaO as carbonate}}{\text{MgO as sulphate}}$ will differ.[2]

An Additional Experiment.

A trial was made with the same sand in smaller pots which received nitrogen as ammonium nitrate, the ratio CaO : MgO being 30 : 1. The manures and treatment were quite the same as in the former experiments. The results obtained are shown in the following table :

Manured with ammonium nitrate.

CaO : MgO		Seeds. gr.	Stalks. gr.	Stumps and roots. gr.	Average per pot. Seeds. gr.	Stalks. gr.	Stumps and roots. gr.	Total. gr.
30 : 1	Pot. 1.	11.0	12.6	7.4	11.4	13.2	3.7	28.3
	„ 2.	11.7	13.8					

For comparison we add here the average figures for the pots with the ratio CaO : MgO = 30 : 1 from the former experiments in which the nitrogen was applied in the form of $(NH_4)_2SO_4$ and $NaNO_3$ in the following table :

1) Bulletin of the College of Agriculture, Tokio Imperial University, Vol. VI, No. 2.
2) Compare the following article by T. Nakamura.

Paddy rice with sodium nitrate.

CaO : MgO 5 : 1 10 : 1 20 : 1 30 : 1 40 : 1 50 : 1 60 : 1

Paddy rice with ammonium sulphate.

CaO : MgO 5 : 1 10 : 1 20 : 1 30 : 1 40 : 1 50 : 1 60 : 1

NH_4SO_4. NH_4NO_3. $NaNO_3$.

No. of Pot.	Kind of Manures.	Seeds. gr.	Stalks. gr.	Stumps and roots. gr.	Total.	
					gr.	ratio.
1.	$(NH_4)_2 SO_4$	14.2	18.2	5.3	37.7	100
2.	$NH_4 NO_3$	11.4	13.2	3.7	28.3	75
3.	$Na NO_3$	5.1	7.1	3.5	15.7	42

This result shows that the application of nitrogen as sodium nitrate is not favorable for rice plants, the relative value of which to ammoniacal nitrogen being 40 : 100. This agrees very well with the result recently obtained by M. Nagaoka.[1] The relative manurial value of ammonium nitrate stands, as seen in the above table, between that of sodium nitrate and ammonium sulphate.

1) Bulletin of the College of Agriculture, Tokio Imperial University, Vol. VI. No. 3.

On the Improvement of a SoilR elatively Deficient in Magnesia.

BY

T. Nakamura.

Near the field of our branch experimental station in Kyūshyū lies a large area of land consisting of a soil very fine in texture but very light for farm implements. The following table gives the information on the composition of the soil.

In 100 parts of the air dried fine soil,

Hygroscopic moisture	11.85
Loss on ignition	19.00
Humus	2.31
Water lost on ignition	16.69
Nitrogen	0.22
Mineral matter insoluble in hot HCl of 1.15 Sp. Gr.	53.24

Mineral matters soluble in hot HCl of 1.15 Sp. Gr.

Al_2O_3	9.60
Fe_2O_3	7.73
Mn_3O_4(1)	——
CaO	1.76
MgO	0.11
K_2O	0.16
Na_2O	0.84
P_2O_5	0.09
SO_3	0 44
SiO_2	0.10
CO_2	0.10
Cl	0 02
SiO_2 soluble in Na_2CO_3	20.35

The mechanical analysis of the original soil gave the following result :

(1) Manganese was present, but not determined.

Over 0·5 m.m.	... ...	0.09 %
0·5 —0·25	,, ...	4.25 ,,
0·25 —0·1	,, ...	25.02 ,,
0·1 —0·05	,, ...	16.32 ,,
0·05—0·01	,, ...	11.32 ,,
below 0·01	,, ...	43.00 ,,

First of all, we see that this soil is characterized by a large quantity of lime in comparison with magnesia. It is also remarkable that the soil, on warming with some HCl, is converted into a gelatinous mass, owing to the separation of much silica. A further characteristic of this soil is a high percentage of silica soluble in sodium carbonate, and of the combined water liberated by ignition. These facts show clearly that this soil consists, to a great deal, of hydrous silicates. Further the exceedingly small quantity of CO_2 compared with CaO indicates that the latter exists chiefly in the form of silicate.

Judging from the amount of magnesia, we see that this soil would certainly contain a sufficient quantity of this base for the normal growth of various kinds of plants, but the quantity of lime is about seventeen times larger than that of magnesia, and if the same ratio of CaO and MgO contained in the soil is absorbed by the plants, they would not grow normally, since the great excess of lime interferes with the function of the magnesia.[1] The proper way to correct the unfavorable ratio of lime and magnesia of this soil, for the growth of Gramineae, would be to add so much magnesia in the form of insoluble hydrous silicate or of powdered magnesite that the ratio of lime to magnesia becomes 1 : 1, for the availability of the magnesia would then agree or nearly so with that of lime. But since magnesite is found only very rarely in this country I intended to use soluble magnesium sulphate, which must of course be applied in much smaller quantity than magnesite.

In order to determine the best quantity of magnesium sulphate to be applied to the soil the following experiments were made

---

(1) Compare the heory of O. Löw in the Bulletin of the College of Agriculture, Imp. University. Tokyo, Vol. V. No. 4.

Twelve zinc pots, each measuring 25 c.m. in diameter and 37 c.m. in height were filled with 9·653 kilog. of the air dried soil, which was taken from a bare field near the experimental station. The soil in each pot contained, therefore, 169.98 g. CaO and 10.10 g. MgO. The excess of CaO over MgO amounted to 159.98 g. (round number 160 g.) In order to increase the amount of magnesia in the soil, the following quantities of $MgSO_4+7Aq.$ were applied :

No. of Pots.	Amounts of magnesium sulphate applied per pot.
1 & 7.	Control
2 & 8.	$160 \times \frac{1}{25}$ g. MgO = 39.36 g. $MgSO^4 + 7Aq.$
3 & 9.	„ $\times \frac{2}{25}$ „ „ = 78.72 g. „
4 & 10.	„ $\times \frac{3}{25}$ „ „ = 118.08 g. „
5 & 11.	„ $\times \frac{4}{25}$ „ „ = 157.44 g. „
6 & 12.	„ $\times \frac{5}{25}$ „ „ = 196.80 g. „

The experiments were made in duplicate. On Nov. 17 (1903) the magnesium sulphate was well mixed with the soil in the pulverized state. On the succeeding days, 0.5 g, P_2O_5 (as disodium phosphate), then 0.25 g. K_2O (as carbonate) and then 0.5 g. N. (as ammonium chloride) were given per pot. On Nov. 23 barley seeds were sown (9 grains per pot).

The observations made during the experiment and the results obtained are given in the following table :

No. of Pots.	1 and 7	2 and 8	3 and 9	4 and 10	5 and 11	6 and 12
$MgSO_4 + 7$ Aq applied, g.	0·00	39.36	78.72	118.08	157.44	196.80
Time of germination.	Dec. 4.	Dec. 5.	Dec. 6.	Dec. 6.	Dec. 11.	Dec. 19.
„ „ flowering	May 14.	May 4.	Apr. 15.	May 5.	May 18.	Jun. 7.
„ „ maturity	Jun. 3.	May 25.	May 25.	May 25.	Jun. 9.	Jun. 9.
Number of days from sowing to maturity.	193.	184.	184.	184.	199.	201
Length of the highest stalk in cm.	105	99	100	98	65	56
Number of stalks with perfect ears.	11	19	22	21	7	1
Number of stalks with imperfect ears.	10	6	3	5	4	3
Number of stalks without ears.	0	0	0	0	1	2
Total number of stalks.	21	25	25	26	12	4
Straw, g.	41.63	46.40	50.42	49.52	25.98	10.65
Full seeds, g.	13.10	16.55	22.10	19.13	4.78	0.58
Empty seeds, g.	1.05	0.95	0.88	0.85	0.77	0.37
Total, g.	55.78	63.90	73.40	69.50	31.53	11.60
Proportion of grain, control = 100.	100.	123	169	146	37	4

As seen from the above table the best result was obtained when 78·72 g. $MgSO_4 + 7Aq$. were applied to the pot. The plants in this pot flowered 28 days earlier and matured 9 days sooner than those of the control pot, and the plus yield amounted to 69%. If, however, magnesia was applied in excess, it exerted a very injurious action on the growh of the plant. On the contrary, the application of a small quantity of magnesium sulphate (0.59 g. as Mg O per pot = 100 kilog. per hectar) remained, as preliminary experiments showed, without effect.

These results show decidedly that the addition of a certain quantity of magnesia acts very beneficially upon the growth of the plant when the soil

contains a large excess of lime over magnesia[1] and furnish at the same time a further proof of the inference that " a maximum yield depends—other things being equal—also upon a certain ratio of lime to magnesia which enters into the plant."

Further, we see from the above results, that the most favorable ratio of lime and magnesia is 7 : 1, provided, the magnesia is applied in the form of sulphate. This result holds good in the case of clayey and perhaps also of certain humus soils, but surely not of sandy soils, to which a much smaller quantity of this sulphate must be applied.

Since the best ratio of lime to magnesia for the growth of cereals was found to be 1 : 1 when magnesia was applied in the form of magnesite, it would have required 333 g. magnesite per pot in order to attain the above ratio. As the best result was, however, obtained when 78.72 g. magnesium sulphate were applied per pot, we may conclude that the relative value or agronomical equivalent of magnesium sulphate to magnesite is here nearly 23 : 100.

(1) *Larbaletrier* and *Malpeau* (Ann. agr. 1896) obtained in France a very favorable result in applying 300 kilog. magnesium sulphate per ha., but in this case also the lime content exceeded the magnesia content consiberably, otherwise the result would certainly have been unfavorable.

On the Stimulating Action of Potassium Iodide upon Sesamum and Spinach.

BY

S. UCHIYAMA.

The stimulating action of very small doses of potassium iodide on rice, oats, radishes and peas was observed by S. Suzuki and Aso.[1] It was of interest to extend such observation also upon other plants. For this purpose, we selected *sesamum* and *spinach*.

I. A Pot Experiment with Sesamum.

The experiment was carried out with six zinc pots of a diameter of 30.4 c.m. ($\frac{1}{137500}$ ha.). On June 26, 1904 each pot received 15 kilo. air dry soil from an unmanured plot of our experimental field, and was then manured with 225 g. farmyard manure and 15 g. bone dust. After two days, the seeds (20 for each pot) were sown, and on July 20, the young shoots were reduced per pot to five of about equal size.

Potassium iodide was fractionally applied in high dilution in three different periods i.e. July 20, 28, and August 5.

At the end of July, some decisive differences could be observed, the treated plants showing more growth and a darker green color.

The crop was harvested on Sept. 22, and weighed in the air dry state. The following table shows the result thus obtained (average of two parallel experiments).

---

1) Bulletin of the College of Agriculture, Tokio Imperial University, Vol. V, No. 4 and Vol. VI, No. 2.

KI in gram.		Average yield per pot in gram.				Comparative yield of full grains
per pot	per ha.	Full-grains	Empty grains	Stems and husks	Total	
0	0	8.50	0.10	19.60	28.20	100
0.0009	123.7	9.85	0.15	25.65	35.65	116
0.009	1237.0	10.65	0.25	25.95	36.85	125

II. A Eield Experiment with Sesamum.

A field experiment was also carried out with *Sesamum.* On June 26, 1904 two plots, each having an area of 59.5 square metres were manured at the rate of 3005 kilo. farmyard manure and 112·7 kilo. each of common superphosphate and straw ash per ha. The seeds were then sown and the young shoots were finally singled out each at a distance of 10 cm. in three fractions i.e. July 13, 20, 27. To one plot, potassium iodide was fractionally applied at the rate of 25 g. per ha. as follows:

I	July 20	0.015 g. KI dissolved in 54 litres
II	August 2	0.045 g. „ „ „ „ „
III	„ 9	0.090 g. „ „ „ „ „

Soon after the second application of potassium iodide, the treated plants showed a more luxuriant growth. The crop was harvested on Sept. 17 and weighed in the air dry state in kilo. as follows:

	Full grains	Empty grains	Stems and husks	Total	Comparative yield of full grains
Control plants	3.494	0.071	14.635	18.200	100
Treated „	4.320	0.101	17.607	22.911	124

III. A Pot Experiment with Spinach.

The experiment was carried out with six zinc pots of a diameter of 25 cm. ($^1/_{20000}$ha.) On July 23, 1904 each pot received 16 kilo. air-dry soil from an

unmanured plot of our experimental field and was then manured with 150 g. compost and 10 g. bone dust. The seeds (20 for each pot) were sown on August 15, and three weeks later the young shoots were reduced (per pot) to six of about equal size.

Potassium iodide was fractionally applied in high dilution in three periods i.e. Sept. 15, Oct. 7 and 15. In the beginning of October, some decisive difference was observed, the treated plants showing better development. The crop was harvested on Oct. 28, and weighed in the fresh state. The following table shows the results thus obtained (average of two parallel experiments).

KI in gram.		Average yield per pot in gram.	Comparative yield
per pot	per ha.		
0	0	22.9	100
0.0006	120.	28.9	126
0.006	1200.	25.9	112

From the results of all these experiments we see that potassium iodide when given in small doses, exerts a stimulating action upon sesamum and spinach. This fact is so far of practical importance, as our farmers on the sea-coast are used to employ as manure sea-weeds which contain more or less potassium iodide.

Bacillus Nicotianae, Sp. nov; die Ursache der Tabakwelkkrankheit oder Schwarzbeinigkeit in Japan.

VON

Y. UYEDA.

In Japan ist eine Tabakkrankheit sehr verbreitet, die unter dem Namen "*Tachigare-byo*" (Stengelfäule), "*Kuromushi*" (Schwarzbeinigkeit) oder "*Ichobyo*" (Welkkrankheit) bereits vor vielen Jahren bekannt war. In 1899 wurde diese Krankheit auf dem Tabakversuchsfelde in der Provinz Sagami ebenfalls beobachtet und um dieselbe Zeit, sammelte ich kranke Tabakpflanzen aus den Provinzen Shinano und Hitachi. Wahrscheinlich war diese Krankheit schon vor ungefähr 20–30 Jahren verbreitet, weil sie schon in "Ensoroku" (einem japanischen Buch über den Tabakbau, publizirt 1881) beschrieben ist, wenn auch wissenschaftliche Beobachtungen darüber gänzlich fehlen. Vor 4 Jahren hat T. Kugahara (in der Versuchsstation der Hukushima-Ken) Bekämpfungsmethoden dieser Krankheit publizirt. Zur ungefähr gleichen Zeit hat Dr. S. Hori, Mykolog in der hiesigen Versuchs-Station eine Serie von Versuchen über die Bekämpfung diesesr Krankheit in der Provinz Hitachi gemacht, wo sie sehr verbreitet ist. Beide Forscher machten jedoch keine ausführliche Mitteilungen über die Ursachen dieser Krankheit. Ferner hatte der Direktor Prof. Y. Kozai der Versuchsstation in Nishigahara eine Art von Bakterien isolirt, welche er für die Ursache der Tabakswelkkrankheit hielt.

Meine Untersuchungen über diese Krankheit begannen vor fast 5 Jahren (1899) und es gelang mir, ein Bakterium zu isoliren, welches mit der von Prof. Kozai aus kranken Tabakpflanzen aus Hukushima isolirten Art identisch ist.

Der betreffende Organismus ähnelt etwas dem Bacillus Solanacearum,

Erwin F. Smith,[1] aber er ist nicht identisch, daher schlage ich einen neuen Namen, Bacillus Nicotianae, vor, dessen kurze Diagnose schon publizirt wurde.[2] Obgleich die Symptome der Tabakwelkkrankheit denjenigen der Eierpflanzen- oder Tomaten-Welkkrankheit sehr ähnlich sind, welche durch Bacillus solanacearum verursacht wird, unterscheiden sich doch beide Bakterien in Beziehungen sowohl der physologischen und morphologischen Eigenschaften als auch ihrer Infektionsfähigkeit. In Folgendem will ich eine Beschreibung dieser Tabakwelkkrankheit, der Ursache, sowie einiger Bekämpfungsmethoden geben, welche in den vergangenen 4 Jahren im hiesigen Laboratorium zur Anwendunh gekommen sind.

SYMPTOME DER KRANKHEIT.

Die Tabakwelkkrankheit kommt sowhl an jungen wie auch an ausgewachsenen Individuen vor, und zwar während der Monate Juni bis September in verschiedenen Gegenden in Japan. Die Krankheit macht sich zuerst durch ein plötzliches Verwelken bemerklich, ein Gelblichwerden des Blattes folgt, hierauf wird der Stengel schwarz und schlieslich werden die ganzen Wurzeln zerstört. Betreffend der Infektion der Tabakpflanze durch Bacillus Nicotianae scheinen mir drei Möglichkeiten vorhanden zu sein, nämlich sie kann durch die Wurzelhaare sowie Hauptwurzel, zweitens durch die Spaltöffnungen des Blattes und drittens durch die beim Köpfen und Geizen verursachten Wunden stattfinden. Wenn die Säfte aus den kranken Pflanzen oder eine Reinkultur von Bacillus Nicotianae auf gesunde Tabakblätter übertragen werden, beginnen schon binnen 1–2 Wochen die Blätter sich zu schwärzen und braune Flecken zu produciren. Die Hauptnerven des Blattes werden zunächst ausgehöhlt und dann zerstört. Die Infektionsversuche wurden an jungen und älteren Tabakpflanzen im Versuchsstationsfelde in Nishigahara ausgeführt. Auf den älteren Blättern erscheinen zuweilen wellenförmige schwarze Flecke entlang den Blattnerven, welche durch die in die Spaltöffnungen eingedrungenen Bacillen verursacht sind. Da die Infektion

1). U. S. Depart. of Agr. Bul. No. 12. (1896)
2). Centbl. f. Bakt. 2 Abt. Bd. 13. S. 329.

oft durch die Wurzeln stattfindet, folgt, dass die Bacillen in der Erde perennieren. So können die zuerst sichtbaren Symptome der Krankheit mit denen der Eierpflanzen- oder Tomaten-Welkkrankheit verglichen werden.[1] Wenn wir den kranken Tabakstengel anschneiden, dann scheidet sich aus den Gefässbündeln eine grosse Menge einer Bakterien enthaltenden Flüssigkeit aus, die etwas alkalisch reagirt. Im Lauf der fortschreitenden Krankheit wird das Rindengewebe des Stengels beträchtlich contrahirt, während zugleich schwarze Linien auf der Oberfläche des kranken Stengels erscheinen. Rinde und Parenchymgewebe der kranken Wurzeln trennen sich voreinander, und zugleich wird das letztere zu einer Anzahl von groben Fasern. Diese Erscheinung kann mit blossen Augen leicht erkannt werden. Der ausgeflossene Saft, sowie die Gefässbündel, Wurzeln, und Blätter der kranken Pflanzen, lassen leicht die im Zellsaft schwimmenden Bacillen erkennen. Diese Krankheit verursacht grossen Schaden durch ihre ungemein schnelle Verbreitung während der Regenzeit. Die hohe Sommertemperatur trägt ebenfalls sehr zur Verbreitung der Krankheit bei.

Im Stengel sowie im Blatte sind die Bacillen zuerst nur in den Gefässbündeln aufzufinden. Daher schwärzen sich zunächst die Nerven und dann erst unterliegt das parenchymatische Gewebe. Wenn man erst kürzlich krank gewordenen Stengel oder Blattstiele anschneidet, sieht man nur lokale Schwärzung des Gefässbündels, während das übrige Gewebe noch gänzlich gesund erscheint.

ANATOMISCHE VERÄNDERUNGEN DER WIRTSPFLANZE.

Wenn wir einen kranken Stengel anschneiden, fällt uns zuerst die Bräunung oder Schwärzung des Gewebes auf, und zwar besonders des Holzgewebes, welches einen schwarzen runden Kreis erkennen lässt. In den ersten Stadien der Krankheit ist nur eine Seite des Stengels schwarz. Häufig lässt er die pathogenen Veränderungen nur nach dem Anschneiden

1). A. a. O.

erkennen, da er erst nach der Berührung mit der Luft schwarz wird und zwar durch den nun stattfindenden Oxydationsvorgang.

Die Krankheit verbreitet sich allmählich aus dem Holzgewebe nach zwei Richtungen, nämlich nach dem Markgewebe sowie nach dem Rindengewebe hin. Die mikroskopischen Beobachtungen lehren uns, dass das Rindenparenchyma stark zerstört wird; Zellsaft, Stärke, Chlorophyll, Zellkern und der übrige Zellinhalt verschwinden; allein die sclerenchymatischen Zellen scheinen nicht so leicht geschädigt zu werden. Ebenso ist dieses beim parenchymatischen Theile des Gefässbündels der Fall, in welchem auch der Zellinhalt allmählich verschwindet. Aus Taf. VI. Fig. 9 kann man erkennen, dass die Bacillen zuerst den Zellkern und dann die ganze Zelle zur Desorganisation bringen. Zuweilen findet man eine Korkschicht zwischen den gesunden und erkrankten Gewebe. Wenn die erkrankten Pflanzen, aus irgend einem Grunde nicht sofort unterliegen, so bilden sie Blätter von anormaler Gestalt aus. Häufig kommen in dem kranken Stengel schmale Höhlungen vor, die mit einer grossen Menge von Bacillen erfüllt sind. Im erkrankten Blatt findet man oft die Bacillen in den Blatthaaren schwärmen. Wenn das Wurzelsystem geschädigt wird, so ist das erste Zeichen der Abtrennung des Bastteiles von Holzgewebe. Obgleich der Holzteil des Gefässbündels weit länger den Angriffen dieser Bacillen widersteht als das parenchymatische Gewebe der Rinde, so wird schliesslich doch das ganze Gewebe zerstört. Diese Zersetzung des Gewebes wird vielleicht durch ein Enzym verursacht, welches durch Bacillen ausgeschieden wird. Auf diese Enzymbildung will ich im nächsten Kapitel zurückkommen. Taf. VI. Fig. 7 zeigt die Zersetzung des erkrankten Gewebes, besonders des parenchymatischen Gewebes im Gefässbündel. Auch erkennt man dort die mikroskopischen Veärnderungen, welche an dem Markgewebe des Stengels aufgetreten sind. Wenn man die reingezüchteten Bacillen auf eine Gewebeschicht überträgt, so wird man bereits binnen einigen Tagen die Schwärzung erkennen und dann erfolgt bald die Trennung dieses Gewebes in die einzelnen Zellen. Oft werden die Blattnerven der kranken Pflanze ausgehöhlt, dann werden die daran angrenzenden Parenchymzellen und auch nicht selten die Schraubengefässe zerstört.

BESCHREIBUNG DER ORGANISMEN.

(A.) Morphologisches.

Form und Grösse. B. Nicotianae ist 1–1,2 μ. lang und 0,5–0,7 μ. dick. Die beiden Enden des Stäbchens sind ziemlich rund, weder spitzig noch eckig; im Wirtsgewebe oft isolirt, aber zuweilen zu zweien verbunden. Bei der Kultur während zwei oder drei Monate bilden sie selten eine kettenförmige Kolonie. Die Grösse des Bacillus variirt mit den Ernährungsverhältnissen z.B. in Bouillon werden die Stäbchen etwas länger als in Agar.

Färbung. Der Tabakswelkbacillus, sei er auf verschiedenen Nährsubstraten kultivirt, kann durch basischen Anilin-Farbstoff leicht gefärbt werden, besonders durch die Ziel'sche Lösung (Karbolfuchsin oder Gentianaviolett); die Färbung mit Bismarkbraun gelang nicht so gut. Durch die Gram'sche Methode gefärbt erscheinen die Bacillen schwach schwarzblau oder rot.

Kapseln. In einer älteren Agarkultur des Bacillus Nicotianae kommen mehrere Kapseln zum Vorschein. Man kann das Schleimigwerden der Bacillen als ein Anfangsstadium der Kapselbildung betrachten. Durch die Färbung mit Karbolfuchsin kann man leicht etwaige Kapseln sichtbar machen. Auch Friedländer'sche Methode gibt gute Resultate. Nach etwa 2 Monaten Kultur in Agar bei Zimmertemperatur (August) bildet sich häufig eine schleimige Masse. Diese Masse ist ohne Zweifel entweder aus vielen Kapseln oder aus gelatinösen Substanzen der Bacillen zusammengesetzt.

Geisseln. Der Bacillus zeigt lebhafte vibrioartige oder wellenförmige Bewegungen. Er ist mit peritrichen Geisseln versehen. Für Geisselfärbung diente mir eine kleine Menge von einer 15 Stunden alten Agarkultur, welche ich in Wasser auf Deckgläschen brachte, auf der Flamme unter Zufügen des Löffler'schen Beizmittels (sauer mit verdünnter Schwefelsäure) während einiger Minuten erwärmte und alsdann mit Wasser abspülte. Nach Waschen mit absolutem Alkohol färbte ich mit Anilinwasser-Gentianviolett, spülte mit Wasser ab und beobachtete. Die peritrichen Geisseln wurden dann sichtbar. Es scheint mir, dass in vielen Fällen Bacillus Nicotianae 4-8 Geisseln besitzt, welche 3-4 mal länger

sind als der Bacillus selbst. Die Färbung geschah auch nach van Ermengem'scher Methode. Ich liess eine geringe Menge von Agarkultur auf Deckgläsern vertrocknen, behandelte sie einige Minuten in der Wärme, mit einer Mischung von einem Teil 2 %iger Osmiumsäure mit zwei Teilen 10-25 %iger Tanninlösung, welcher 4-5 Tropfen Eisessig auf 100 ccm zugesetzt worden waren, spülte mit Wasser, dann mit Alkohol ab, behandelte mit einer Silbernitratlösung (2 %) während weniger Sekunden, und legte sie dann in's Reduktionsbad, welches aus 13 g. Gallussäure, 3 g. Gerbsäure, 100 g. Natronacetat, 350 g. Wasser bestand, dann wieder in Silbernitrat. Nach Wiederabspülen mit Wasser liess ich das Präparat trocknen.

Sporen. Auf festem Nährsubstrat oder in nährstoffarmen Lösungen werden die Sporen nach etwa einem Monat gebildet. Die Sporenbildung dieser Bacillen ist wichtig, nicht nur in wissenschaftlicher, sondern auch in praktischer Hinsicht, weil sie wahrscheinlich in den Tabaksfeldern während der kalten Winterzeit in den nördlichen Provinzen Japans andauern dürfte. Sehr oft findet man Sporen in Agarstrichkulturen (Zimmertemperatur, September), welche 3 Monate alt sind; es ist jedoch zu bemerken, dass in dem unteren Theil einer Strichkultur, wo man häufig schleimige Massen wahrnimmt, die Sporenbildung nicht eintritt.

(B). Physiologisches.

Bouillon. In neutraler Rindfleischpepton-Lösung, bei Zimmertemperatur in Juli, wächst Bacillus Nicotianae sehr schnell und üppig, so dass binnen eines Tages die Flüssigkeit trüb und bereits nach 3 Tagen eine dünne Haut gebildet ist. Bei starkem Schütteln der Kulturgefässe bricht die Haut, welche in ihren dicken blauen und dünneren weissen Teilchen einen mosaikartigen Anblick darbietet. Nach einer Woche nimmt die Färbung der Nährlösung zu, und es bildet sich ein grauweisser Bodensatz aus Bakterienmassen. Allmählich wird die Haut grau und ziemlich körnig und nach etwa einem Monat sieht man oft einen schwarzen Ring um dieselbe. Der Bodensatz ist gewöhnlich nicht sehr schleimig. Die Nährlösung wird bisweilen braun gefärbt. Bei Kultur in einem Erlenmeyer'schen Kolben mit Bouillon,

nimmt, nach zwei Wochen bei Zimmertemperatur im Oktober, die Lösung eine tief graubraune Färfung an. Traubenzucker-Bouillon ist für das Wachstum dieser Organismen sehr günstig. In älteren Bouillonkulturen, findet man eine grosse Menge von rhomboidalen Krystallen, welche vielleicht aus Ammoniummagnesiumphosphat bestehen.

Gelatineplattenkulturen. 1-2 Tage nach Infektion im Gelatinenährboden erscheinen kleine Kolonien im Innern sowohl als auf der Oberfläche. Bei etwa 50 facher Vergrösserung stellen die Oberflächenkolonien als rundliche, hellgraue, nach der Mitte zu dunklerwerdende etwas körnige Scheiben mit mehr oder weniger unregelmässigen Rand dar. Nach 4-5 Tagen, verflüssigen die älteren Oberflächenkolonien allmählich die Gelatine in centrifugaler Richtung, und alsdann sieht man in dem verflüssigten Theil ein Sediment von Bakterien. Nach 6 Tagen werden die Kolonien etwas becherförmig. Nach einer Woche behalten die in der verflüssigten Gelatine schwimmenden Kolonien noch ihre ursprüngliche Form bei, ohne zu brechen. Die in der Tiefe liegenden Kolonien weisen eine ellipsoidische Form auf, und bereits binnen wenigen Tagen verschmelzen sie zu einer sehr kleinen Masse.

Gelatinestrichkulturen. Nach etwa 2 Tagen, ist die Gelatine längs der Infektionslinie verflüssigt, so dass eine Rinne gebildet wird. Im kondensirten Wasser sammelte sich eine ziemlich grosse Menge des Sedimentes, und zuweilen ist eine dünne Haut auf der Flüssigkeit gebildet. Gelatine wird bereits binnen 2 Wochen ganz verflüssigt.

Gelatinestichkultur. Nach 2 Tagen ist die Gelatine in Nähnadelkopfform verflüssigt; nach 4 Tagen ist eine trichterförmige Höhlung gebildet und dann sieht man ein Sediment in ziemlich grosser Menge. Auf der verflüssigten Lösung wird fast immer eine dünne Haut gebildet. Nach etwa 3 Wochen wird die ganze Gelatine verflüssigt, und allmählich ziemlich grauschwarz gefärbt.

Agarplattenkulturen. Auf Agarplatten erscheinen bereits binnen 24 Stunden (bei Zimmertemperatur im August) kleine Kolonien, die zuerst einen scharfen Umriss haben und rundlich, nass glänzend und schwach grauweiss sind. Nach etwa einer Woche nehmen diese Kolonien eine rötliche Färbung an, die sich allmählich grauschmutzig und schwarz verändert.

Häufig kommen in den Plattenkulturen einige Riesenkolonien vor, die später konzentrische Kreise bilden. Diese Erscheinungen kommen nicht immer vor, wenn z. B. die Temperatur auf etwa 25°C. gehalten wird. Sehr selten werden konzentrische Riesenkolonien gebildet, welche einen gezackten Umriss haben. Die in Agar tiefliegenden Kolonien sind manchmal elliptisch oder eiförmig, sehr dünn und nach allen Seiten sich ausbreitend; sie sind durch ihren hohen Glanz beim suffallenden Lichte ausgezeichnet. Mehrere rhomboidische Krystalle, welche aus Ammoniummagnesiumphosphat bestehen, kommen häufig in den Agarplattenkulturen vor. Die oberflächlichen Kolonien sehen zuerst weiss aus, aber nach ca. 2 Wochen bei einer Temperatur von 32°C. werden sie grau. Der später gebildete Strahlenkranz hat einen gezackten Umriss. Die in der Tiefe liegenden Kolonien sehen beim auffallenden Licht blauweiss aus, und fluoresciren mehr oder weniger. Ihr Durchmesser beträgt meist 1 mm.. Die oberflächlichen Kolonien sind nicht gekörnt, sondern sehr glatt, ferner feucht und hell in ihrem Centrum. Häufig ist eine Haut auf den Riesenkolonien gebildet.

Agarstrichkulturen. In Agarstrichkulturen bei Zimmertemperatur im September, beginnt Bac. Nicotianae schon binnen 24 Stunden auszuwachsen. Längs der Infektionslinie bildet sich eine weissliche Auflagerung von nassem und glänzendem Aussehen. Binnen einer Woche wird diese Auflagerung mehr oder weniger schleimig. Weder seitenständige fingerähnliche Fortsätze, noch blattförmige Auflagerungen werden gebildet.

Agarstichkultur. Nach einer Woche (bei Zimmertemperatur im Juli) findet schnelles Wachstum von Bac. Nicotianae längs der Stichlinie statt, und besonders auf der Oberseite. Im Infektionspunkt ist das Wachstum der Bacillen am üppigsten; alsdann beginnt eine schwarze Färbung im oberen Theil des Nähragars. Die Auflagerung ist sehr dünn, grauschwarz an der Oberfläche.

Kartoffeln. Auf gedämpften Kartoffelscheiben wächst Bac. Nicotianae bei Zimmertemperatur (Juli) sehr schnell längs der Strichlinie und später ist eine grüngelbliche Auflagerung gebildet. Bereites binnen 1–2 Wochen nimmt das Substrat eine mehr oder weniger grauschwarze Farbe an. Der durch die

Bacillen ausgeschiede Farbstoff löst sich im Wasser auf und diffundirt in das Pflanzengewebe. Auf der Oberfläche von Kartoffelschnitten, wächst Bac. Nicotianae ziemlich gut (bei Temperatur von 25°C.); bereits binnen 1–2 Wochen wird das Pflanzengewebe gänzlich zerstört. Von dem geimpften Theile aus verbreitet sich Bac. Nicotianae nach den umgebenden Zellen, welche nun ein feuchtes Aussehen erhalten. Alsdann erfolgt Aushöhlung und Schwärzung des Katoffelgewebes. Diese Schwärzung des Wirtgewebes ist als ein besonderer Charakter von Bac. Nicotianae aufzufassen; sie wird durch ein ausgeschiedenes oxidirendes Enzym, Tyrosinase, verursacht.

Gekochte Möhren, Rettig und Bataten. Auf gekochten Möhrrüben, sehen die Kolonien von Bac. Nicotianae zuerst gelblich aus. Nach einigen Tagen produciren sie einen unangenehmen Geruch. Auf gekochten Rettigscheiben erzeugte dieser Bacillus einen scharfen Geruch bereits binnen 1 oder 2 Wochen nach der Infection. Dann erfolgt die Zerstörung der Gewebe. Der Bacillus wächst auch ziemlich gut auf gekochten Bataten.

Milch. Der Bacillus wächst sehr gut in Milch. Dieselbe wird durch das Bacterienwachsthum erst stark sauer, das dabei ausgeschiedene Koagulum löst sich aber allmälich auf. Schliesslich nimmt die Milch eine chokoladenartige Färbung an und zeigt eine schwach alkalische Reaktion.

Uschinsky'sche Lösung. In dieser Lösung findet nur ein geringes Wachstum statt.

Verhalten gegen verschiedene Temperaturen. Aus den unter verschiedenen Bedingungen mit vielen Kulturmedien ausgeführten Untersuchungen geht hervor, dass die Optimumtemperatur für das Wachstum des Bacillus bei ca. 32°C. liegt. Der Bacillus besitzt keine besondere Widerstandsfähigkeit gegen höhere Temperatur. Eine 10 Minuten dauernde Erhitzung des Bacillus in Bouillon auf 54°C. tötete denselben mit Sicherheit ab, während bei 53°C. der Erfolg kein regelmässiger war.

Verhalten gegen Sauerstoff. In 3 bis 5 % Zucker enthaltenden Agarstichkulturen wächst Bac. Nicotianae ziemlich gut, sowohl in der Tiefe als auch an Oberfläche. Er ist fakultativer Anaërob. In einer mit Bouillon gefüllten Gährungsröhre gedeiht er sowohl im geschlossenen als

auch im offenen Teil der Röhre. Auch in KITASATO's und GABRITSCHEWSKI's Plattenschale mit Wasserstoffatmosphäre wächst er ziemlich gut.

Verhalten gegen Wasserstoff. Wenn Bouillon mit dem Bacillus inficirt und in reiner Wasserstoffatmosphäre gehalten wird, so zeigt sich eine Trübung binnen einer Woche und bildet sich allmählich eine Haut, welche beim Schütteln zerfällt und kleine Zoogloeamassen liefert. Zugleich erhebt sich das Sediment und bleibt lange in der Flüssigkeit suspendirt.

Vergleichen wir die Kulturen von BAC. NICOTIANAE und BAC. CAROTOVORUS mit einander, so ergibt sich manche Aenlichkeit, aber bei dem letzteren treten schleimige Sedimente auf, bei dem ersteren nicht.

Säure-Produktion. Der Organismus producirt in zuckerhaltigen Nährböden eine geringe Menge von Säure. In Peptonwasser tritt dagegen eine schwach alkalische Reaktion ein.

Reduktionsfaehigkeit. Eine mit 1 % iger Methylenblau-Lösung gefärbte Bouillon wird bald reducirt, wobei die ursprüngliche blaue Farbe verschwindet, wenn die Luft abgehalten wird, sonst tritt an der Oberfläche die blaue Farbe stets wieder auf. Kultivirt man BAC. NICOTIANAE in Kaliumnitrat enthaltenden Lösungen, so kann man nach ein bis zwei Tagen die Reduktion zu Nitrit durch die Griess'schen Reaktionen machweisen (Metaphenylendiamin oder Sulfanilsäure + α-Naphthylamin); das durch Reduktion producirte Nitrit ist besonders bei der letzteren Reaktion leicht erkennbar wegen der intensiv rothen Färbung.

Indolreaktion. In jüngeren Kulturen von BAC. NICOTIANAE in einer Lösung von Pepton oder in Bouillon, konnte ich eine schwache Indolreaktion erkennen Bereits binnen 10 Tagen nach der Infektion von 5 %iger Peptonlösung wurde sie schwarz, so dass die Indolreaktion unmöglich wurde.

Produktion von Schwefelwasserstoff. Ich liess einen mit verdünnter Bleiacetatlösung benetzten Filtrierpapierstreifen in den Reagensgläsern hängen, in welchen die Bacillen kultivirt wurden. Binnen einigen Wochen begann das Papier sich zu schwärzen, was die Produktion von Schwefelwasserstoff beweist.

Verhalten im Erdboden. Um zu beobachten, wie tief in dem inficirten Erdboden der Welkbacillus wachsen order wenigstens lebend bleiben kann,

untersuchte ich den Erdboden aus verschiedenen Tiefen im Tabaksfelde bei Nishigahara. Vor allem stellte ich Plattenkulturen von der Erde her; unter den vielen nach einigen Tagen sichtbaren Kolonien waren auch die des Welkbacillus aufzufinden.

Tiefe des Erdbodens.	Beobachtung in der Petrischale.
3,5 Dm.	Kolonien von Bac. Nicotianae sichtbar.
3,0 „	„ „ „ „ „
2,5 „	„ „ „ „ „
2,0 „	„ „ „ „ „
1,5 „	„ „ „ „ „
1,0 „	„ „ „ „ „
5 Cm.	„ „ „ „ „
Oberfläche des Feldes.	„ „ „ „ „

Farbstoffbildung. Der Welkbacillus bildet einen schwarzen Farbstoff, welcher sowohl auf der Wirtpflanze als auch auf den Kulturmedien zuerst als grauweisse dann braune Färbung auftritt. Die Produktion des Farbstoffes hängt von vielen Bedingungen ab, besonders von der Temperatur. Auf Agar, Bouillon, Kartoffel, Gelatine und Milch, wird dieser Farbstoff bei bestimmten Temperaturen nach einigen Tagen gebildet; im August bei etwa 30°C Lufttemperatur erfolgt die Produktion des Farbstoffes sehr schnell. Etwa ein oder zwei Wochen nach der Impfung auf Agar, verändert sich die ursprüngliche grauweisse Farbe der Kolonien zu einer rötlichen, welche sich aber rasch zu einer schwarzen umwandelt. Auf Kartoffeln nimmt die Kolonie des Bacillus zuerst eine grauweisse Färbung an, die sich alsdann in eine schmutzig gelblichgrüne und schliesslich in einer graue oder schwarze verändert. Bouillon und Milch werden gänzlich geschwärzt bei höheren Temperaturen (ca. 35°), wobei oft ein schwarzer Ring an den Glaswänden an der Oberfläche der Flüssigkeit gebildet wird. Der von den Bacillen gebildete Farbstoff ist leicht löslich in Wasser (aus Agarstrich), sehr wenig in Alkohol und Glycerin, nicht in Benzin, Aether und Chloroform. Diese Farbstoffbildung ist keineswegs so beschränkt wie bei dem von Erwin F. Smith beschriebenen Bac Solanacearum, bei welchem die Farbstoffbil-

dung nur in den Alkalien und Glucose enthaltenden Nährflüssigkeiten stattfindet. Unser Bacillus bildet seine braunschwarze Farbe nicht nur in Glucoseagar oder in alkalisch gemachtem Agar, sondern auch in fast allen anderen Nährsubstraten bei 30–40°C.

Ich habe mehrmals Reinigungsversuche des Farbstoffes unternommen nach den Methoden, welche Brieger bei der Untersuchung von Bac. Cyanogenes benutzte, doch hatte ich keinen befriedigenden Erfolg.

Enzymbildung. Der Welkbacillus scheidet Invertin aus; ich konnte feststellen, dass das Filtrat der Bouillonkultur durch das Chamberland'sche Filter schon nach einen Tag Saccharose invertirt. Auch eine sehr geringe Menge von Diastase scheint er auszuscheiden.

Es scheint mir, dass der Bacillus Cytase ausscheidet; zuerst beobachtete ich bei einem Fragment eines sterilisirten Tabaksstengels, das mit Bac. Nicotianae geimpft war, mit Hülfe der Tropfenkultur, dass nach 3–4 Tagen die Mittellamellen etwas gequollen waren. Eine solche Erscheinung hat Potter auch bei seiner Untersuchung über den Rübenfäulnissbacillus, Pseudomonas Destructans beobachtet. Der Welkbacillus greift die Zellwände des Tabaks in rechtwinkeliger Richtung an, was bei der Tropfenkultur leicht zu beobachten ist. Wenn durch das Chamberland'sche Filter filtrirte Bouillonkultur auf die Oberfläche des Tabaksblattes geimpft wird, macht sich nach zwei oder drei Wochen eine gelblichschwarze Veränderung desselben bemerkbar (August). Diese Tatsache deutet ebenfalls an, dass Cytase durch Bac. Nicotianae ausgeschieden wird.

Während meiner vorliegenden Untersuchungen beobachtete ich die sehr interessante Tatsache, dass der Bacillus ein oxidirendes Enzym und zwar Tyrosinase ausscheiden kann. Wenn man Paraphenylendiamin und β-Naphthol (Spitzer's Reaktion) zu einer frischen Agarstrich-oder Bouillonkultur des Bacillus hinzufügt, so entwickelt sich eine schwach rote Färbung, die bald nachher schwarz wird. Wenn man eine 1–5 % ige Tyrosinlösung zu einer Bacillenkultur gibt, so nimmt sie rascher eine rotschwarze Farbe an, als ohne jenen Zusatz. Diese Reaktionen zeigen, dass der Welkbacillus Tyrosinase ausscheidet.

Wenn man einer etwa einen Monat alten Gelatinekultur einige Tropfen

Chlorwassers hinzufügt (nach Neumeisters's Tryptophan Reaktion), verändert sich die Farbe der Lösung zu einer roten; ebenso liefert Brom mit jener Cultur eine violette Färbung. Dies ist characteristisch für die Trypsinverdauung.

Einfluss der Ernährung auf das Wachstum gewisser Bakterien.

Vergleichende Versuche mit B. NICOTIANAE und anderen Bakterien, um den Einfluss der Ernährung auf ihr Wachstum sowie den von Magnesiumverbindungen auf ihr Farbstoffbildungsvermögen zu beobachten, ergaben die aus der folgenden Tabelle ersichtlichen Resultate :—

Mineralösung. +

KH_2PO_4 0,1 %
$MgSO_4$ 0,3 %
NaCl 0,5 %

	Stickstoffquelle.		Kohlenstoffquelle.	Reakt.
1).	Pepton 1 %	+	o	Alk.
2).	„ „	+	Dextrose 1 %	Alk.
3).	Asparagin 1 %	+	o	Alk.
4).	„ „	+	o	Sauer.
5).	„ 2 %	+	Dextrose 1 %	Alk.
6).	„ 1 %	+	„ „	Sauer.
7).	Ammontartrat 1 %	+	o	Alk.
8).	„ „	+	Glycerin 1 %	Alk.
9).	Kaliumnitrat 1 %	+	Dextrose 1 %	Alk.
10).	„ „	+	Glycerin 1 %	Alk.
11).	Chlorammon 1 %	+	„ „	Sauer.
12).	„ „	+	Dextrose 1 %	Sauer.
13).	Bouillon.			

	B. Nicotianae.	B. Solanacearum.	B. lactis niger.	B. Cyanogenes.	B. Pyocyaneus.
1.)	Norm. Entw.	Schw. Entw.	Schw. Entw.	Schw. Entw.	Schw. Entw.
2.)	Stk. Entw.	Norm. Entw.	Norm. Entw.; getrübt.	Keine Entw.	Norm. Entw.
3.)	S. Schw. Entw.	Norm. Entw.; Hautbildg.	Schw. Entw.	Schw. Entw.; dünne Hautbildg.	Schw. Entw.; grün.
4.)	„ „ „	Keine Entw.	Keine Entw.	Keine Entw.	Norm. Entw.; Nicht grün.
5.)	Norm. Entw.; Hautbildg.	Stk. Entw.	Keine Entw.; Weisse dicke Hautbildg.	Norm. Entw.	Stk. Entw.; gelbgrün Fluoresc.
6.)	Keine Entw.	Keine Entw.	Keine Entw.	Keine Entw.	Schw. Entw.
7.)	„ „	„ „	„ „	„ „	Keine Entw.
8.)	„ „	„ „	Schw. Entw.	S. Schw. Entw.	Schw. Entw.; grün.
9.)	„ „	Schw. Entw.	Keine Entw.	Schw. Entw.	Stk. Entw.; grün.
10.)	„ „	Norm. Entw.; getrübt.	S. Schw. Entw.	S. Schw. Entw.	Norm. Entw.; grün.
11.)	„ „	Keine Entw.	Keine Entw.	Keine Entw.	Norm. Entw.
12.)	„ „	Schw. Entw.	Schw. Entw.	„ „	Schw. Entw.; blau.
13.)	Stk. Entw.; Hautbildg.	S. Stk. Entw.	Norm. Entw.; Hautbildg.	Stk. Entw.	Stk. Entw.

Wie diese Tabelle zeigt, wächst B. NICOTIANAE üppig, sowohl in der Pepton + Dextrose, als in Asparagin + Dextrose Lösung ; für B. pyocyaneus scheint jedoch die letztere viel geeigneter zu sein als die erstere. Während Asparagin für das Wachstum von B. Solanacearum sehr günstig ist, ist es nicht der Fall bei B. Nicotianae. Kaliumnitrat-, Chlorammonium-, oder Ammontartrat-lösung (mit Dextrose oder Glycerin) ist für das Wachstum von B. Nicotianae nicht geeignet, für B. pyocyaneus besser, besonders die erstere ist sowohl für das Wachstum als auch die Farbstoffbildung des Bacillus günstig.

Wiederholte Versuche zeigen, dass die Farbstoffbildung durch B. NICOTIANAE von Magnesiumsalzen unabhängig ist.

Unterschied zwischen Bac. Nicotianae und anderen Bacillen.

Es wurden zunächst Kulturen von folgenden Bakterien hergestellt :—

1). Bacillus carotovorus.	2). B. Cubonianus.
3). B. vitivorus.	4). B. omnivorus.
5). B. atrosepticus.	6). B. Baccarinii.
7). B. cyanogenes.	8). B. mesentericus niger.
9). B. lactis niger.	10). B. Solanacearum.

Die Bacillen Nr. 7–10 bilden einen grauen oder schwarzen Farbstoff, die von Nr. 1–6 aber nicht. Nur die von Nr. 1–6 und auch Nr. 10 sind phytopathogen. In Folgendem sind die Unterschiede von den farbstoffliefernden Bacillen Nr. 7–10 hervorgehoben.

B. cyanogenes. Auf alkalisch reagirendem Nähragar bildet der Bacillus einen braunschwarzen Farbstoff, aber einen blauen in einem saurem Nährsubstrat (besonders in Milch) ; verflüssigt nicht Gelatine ; die Stäbchen sind grösser und länger als die des B. NICOTIANAE.

B. lactis niger. Auf Agar bildet dieser Bacillus einen schmutzig-grauen Farbstoff ; die Stäbchen sind grösser als die von B. NICOTIANAE. B. lactis niger bildet oft fadenförmige Zoogloea und ferner sehr leicht elliptische Sporen, welche denen von B. subtilis mehr ähneln als denen von B. Nicotianae.

B. mesentericus niger. Bildet sehr leicht grosse Sporen in verschiedenen Nährsubstraten ; auf Agar oder Kartoffeln bildet er eine faltige Haut, wie der Kartoffelbacillus, was aber B. Nicotianae nicht tut.

B. Solanacearum. Verflüssigt Gelatine weit langsamer, als B. Nicotianae. Die ausführlichen vergleichenden Versuche sind wie folgt:—

BACILLUS NICOTIANAE.	BACILLUS SOLANACEARUM.
1). In Gelatinestrichkultur wächst der Bacillus ziemlich schnell, zuerst weiss, allmählich schwarz.	1). Auf Gelatinestrichkultur wächst der Bacillus sehr langsam, längs den Strichlinien. Die Färbung ähnelt mehr oder weniger der von B. Nicotianae.
2). Verflüssigt Gelatine ziemlich schnell, binnen etwa 2 Wochen bildet er Häutchen auf der Oberfläche des Gelatinestriches.	2). Verflüssigt Gelatine sehr schwach binnen 5 oder 6 Wochen.
3). Bildet etwas Gas in Glycoseagar oder Glycosebouillon, und producirt schwach ranzigen Geruch, ferner eine geringe Menge Säure.	3). Bildet auf Kartoffeln oder in glycosehaltiger Nährlösung kein Gas, auch keine Säuren auf Kartoffeln oder in Peptonwasser oder Bouillon, zu welchem Traubenzucker hinzufügt ist. Neutrale oder schwach sauer reagirende Nährlösung wird rasch alkalisch.
4). Milch wird anfangs koagulirt aber das Koagulum allmählich gelöst und peptonisirt.	4). Milch wird weder peptonisirt noch koagulirt.
5). Auf Kartoffeln bildet der Bacillus einen gelblichgrünen Farbstoff, der allmählich graubraun, zuletzt schwarz wird. Auf Agar werden runde schmutzig weisse Kolonien gebildet, die allmählich braunschwarz werden.	5). Bildet einen braunen Farbstoff in Nähragar oder in Peptonwasser, welches Traubenzucker enthält. Auf Kartoffel bildet der Bacillus zuerst einen gelblichweissen Farbstoff, welcher dann braun, zuletzt rauchschwarz wird.
7). Wächst am besten bei einer Temperatur von 32°C. Thermaltodpunkt ca. 55°.	7). Wächst üppig bei 37°C. Thermaltodpunkt ca. 52°C.
8). Fakultativ anaerobisch.	8). Streng aerobisch.
9). In Peptonbouillon oder Mohrrüben producirt der Bacillus einen unangenehmen Geruch.	9). Kein merklicher Geruch in den verschiedenen Kulturmedien.
10). Mit Methylenblau gefärbte Milch wird leicht reducirt. Durch Griess'sches Reagens kann man die Reduktion von Nitrat zu Nitrit nachweisen.	10). Es sind keine Reduktionsvorgänge wahrnehmbar.
11). Weist eine schwache Indolreaktion auf bei den Kulturen in Peptonlösung.	11). Keine Indolreaktion.
12). Bildet eine Oberhaut auf Bouillon binnen 3-4 Tagen.	12). In Bouillon oder Peptonlösung, bildeter binnen 1-2 Wochen eine Haut.
13). Gram'sche Färbung positiv.	13). Gram'sche Färbung negativ.
14). Sporen und Kapseln vorhanden.	14). Weder Sporen noch Kapseln.
15). Parasitisch für Nicotiana tabacum und Capsicum, nicht aber für Eierpflanze und Tomate.	15). Parasitisch für Eierpflanze und Tomate, nicht aber für Nicotiana und Capsicum.

Diagnose des Bac. Nicotianae und Schlussbemerkungen.

B. Nicotianae gehört zu den kleinen Bakterien mit runden Enden; die Stäbchen sind 1,0—1,2 μ lang und 0,5—0,7 μ dick. Er bleibt oft isolirt, zuweilen zu 2–4 verbunden. Bewegung durch mehrere peritriche Geisseln. Wächst üppig auf gewöhnlichen Nährsubstraten und verflüssigt Gelatine. Auf Kartoffeln bildet der Bacillus anfangs eine gelblichgrüne Auflagerung, welche nach einer Woche grauschwarz wird. Fakultativ anaërob. Liefert nur schwache Gasentwicklung. Reducirt leicht Lakmusmilch und Methylenblau, ferner Nitrat zu Nitrit. Koagulirt Milch, das Koagulum wird dann allmählich gelöst und peptonisirt.

Optimumtemperatur für das Wachstum 32°C.; Maximumtemperatur 55°C.

Auf vielen Nährsubstraten producirt der Bacillus einen schwarzen oder grauschwarzen Farbstoff. Trypsin und Tyrosinase werden sicher ausgeschieden.

Der Bacillus ist in welkkranken Tabakspflanzen in verschiedenen Gegenden in Japan vorhanden und ist die Ursache der sogenannten Welkkrankheit. Der Bacillus greift verschiedene Varietäten von Tabakspflanzen an, nicht aber Nicotiana rustica; auch einige Varietäten von Nicotiana tabacum (Ōhasama, Taketadate, Mitsuke, Kentucky white, Green river prior) werden nicht leicht angegriffen. Impfversuche auf Physalis minimum, Capsicum longum, Amarantus gangeticus und Polygonum tinctorium fielen positiv, aber bei Solanum melongena, Lycopersicum esculenta, und Physalis Alkekengi negativ aus.

Die Frühpflanzung ist ein Schutzmittel gegen die Tabakwelkkrankheit.

Die Austrocknung des inficirten Tabaksfeldes bei höheren Sommertemperaturen ist für den Zweck der Vernichtung des Welkbacillus sehr wichtig. Auch das Brennen des inficirten Erdbodens wirkt ohne Zweifel günstig, wenn es auch schwer auszuführen ist. CS_2 und Aetzkalk sind für die Vernichtung des Bacillus mehr oder weniger brauchbar. Für die Tabaksbauer ist die Klärung der inficirten Tabaksfelder z. B. Verbrennung der erkrankten

Pflanzen zu empfehlen. Stickstoffreiche Düngung disponiert die Pflanzen zur Welkkrankheit, aber Kalidüngung nicht.

Es mag noch die Frage aufgeworfen werden, ob denn die durch die Welkkrankheit zu Grunde gegangenen Pflanzen gar keine Verwertung mehr finden könnten? Darauf sei erwiedert, dass die Blätter nach einem raschen "Flue-curing" wohl als geringere Qualitäten von Pfeifentabak noch verwertet werden könnten. Ferner kann ein Extrakt daraus hergestellt werden; Tabaksextrakt hat als insektentötendes Mittel bekanntlich einen bedeutenden Wert.

Zum Schluss spreche ich Herrn Direktor, Professor Y. Kozai, für gütige Unterstützung bei dieser Arbeit meinen besten Dank aus.

TAFELERKLAERUNG.

TAFEL IV.

Fig. 1. Erkrankte Tabakspflanzen im Tabaksversuchsfeld bei Öta (1904 phot. von Herrn Dr. G. Daikuhara).

Fig. 2. a) Kranke Tabakswurzel. (1903 phot.)

Fig. 2. b) Gesunde Tabakswurzel.

TAFEL V.

Fig. 3. Kranke Tabakspflanze mit welken Blättern und schwarzem Stengel. (ca. 1/2 veskürzt.)

Fig. 4. Längsschnitt des Stengels einer welken Tabakspflanze. (nat. Grösse.)

Fig. 5. Querschnitt „ „ „ „ „

TAFEL VI.

Fig. 6. Querschnitt von einer erkrankten Tabakspflanze. (ca. 115 mal vergr).
a) Wenig erkrankte-, b) starke erkrankte, contrahirte Gewebe.

Fig. 7. Querschnitt durch den erkrankten Tabaksstengel (ca. 140 mal.)

Fig. 8. a) Mit B. Nicotianae bespritzte Blätter (2 Wochen nach Spritzung). (S. Nagai del.)
b) Querschnitt eines erkrankten Tabaksblattes, besonders die Spiral-und Tüpfelgefässe des Blattnerves sind erfüllt mit dem Bacillus.

Fig. 9. Erkrankte Tabaksgewebe, Zellkern löst sich allmählich.

TAFEL VII.

Fig. 10. Gelatinestrichkultur des B. Nicotianae (eine Woche nach Inficirung).

Fig. 11. Gelatinestichkultur des Bacillus.

Fig. 12. Agarplattenkultur von B. Nicotianae ; Kolonien 8 Tage alt, weisslich.

Fig. 13. Agarplattenkultur von B. Nicotianae; a) weisse Kolonien, b) konzentrische, 2 Wochen alte, schwarze Kolonien.

TAFEL VIII.

Fig. 14. Agarstrichkultur; Auflagerung schneeweiss.

Fig. 15. Agarstrichkultur mit schwarz gefärbter Auflagerung. (2 Wochen alt).

Fig. 16. Agarstichkultur.

Fig. 17. Kartoffelscheiben-Kultur, schwarze Auflagerung (2 Wochen alt).

Fig. 10. Bouillonkultur (eine Woche alt).

Fig. 19. Milchkultur (nach 2 Wochen).

Fig. 20. Mikrophotographie von B. Nicotianae (ca. 1000 mal verg.) (Phot. von Herm S. Nagai).

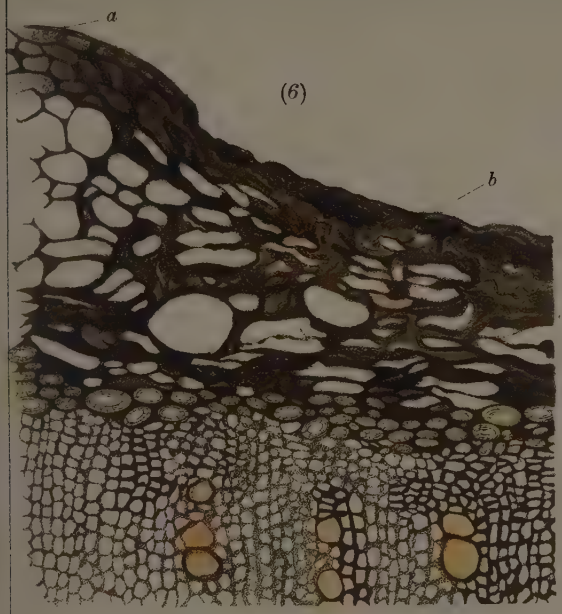
Fig. 21. B. Nicotianae (ca 1200 mal verg).

1

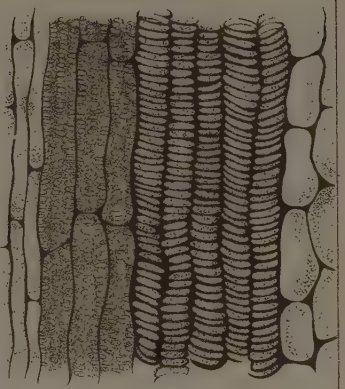
2

(4)
(5)
(3)

(6)

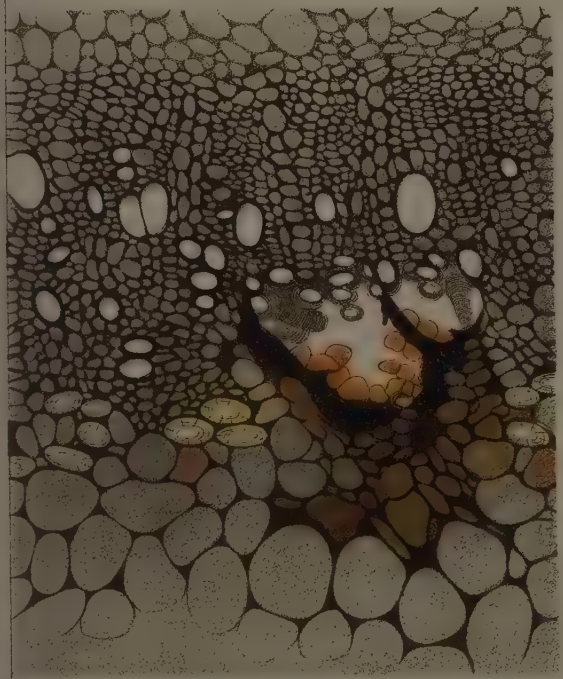


(8)b

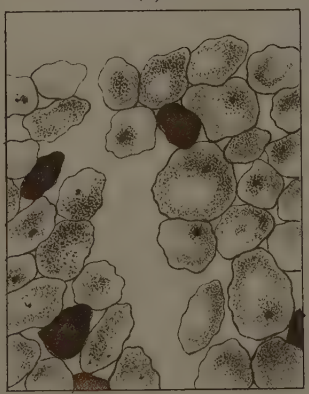


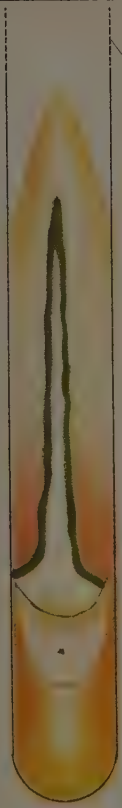
(8)a

(7)

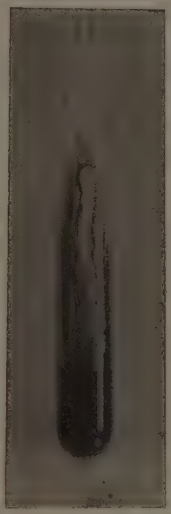


(9)

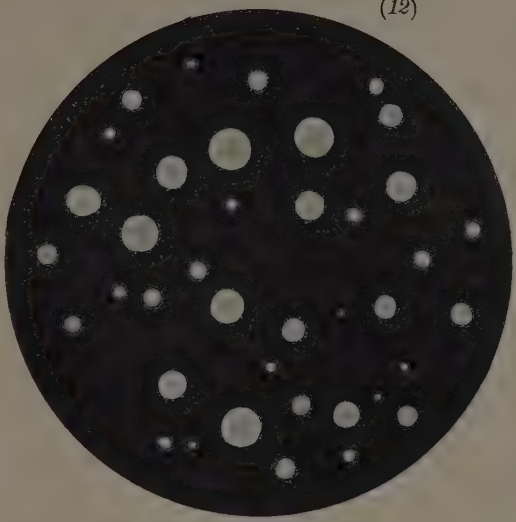


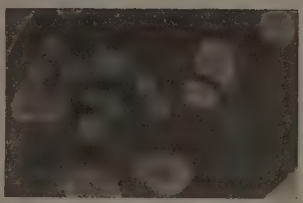


(10)



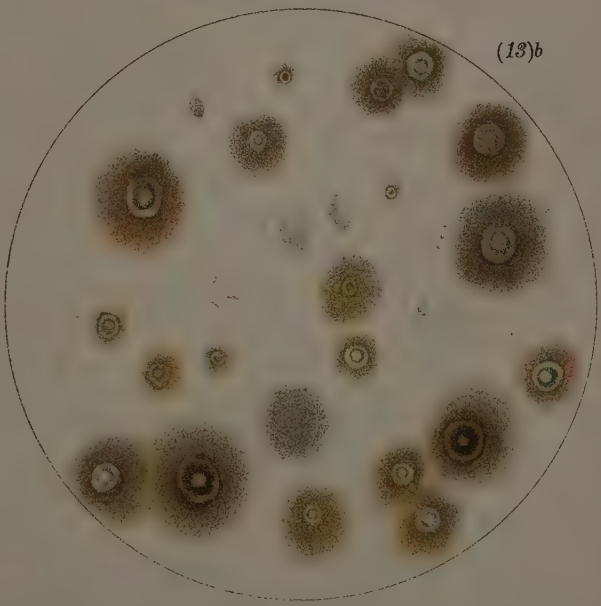
(12)



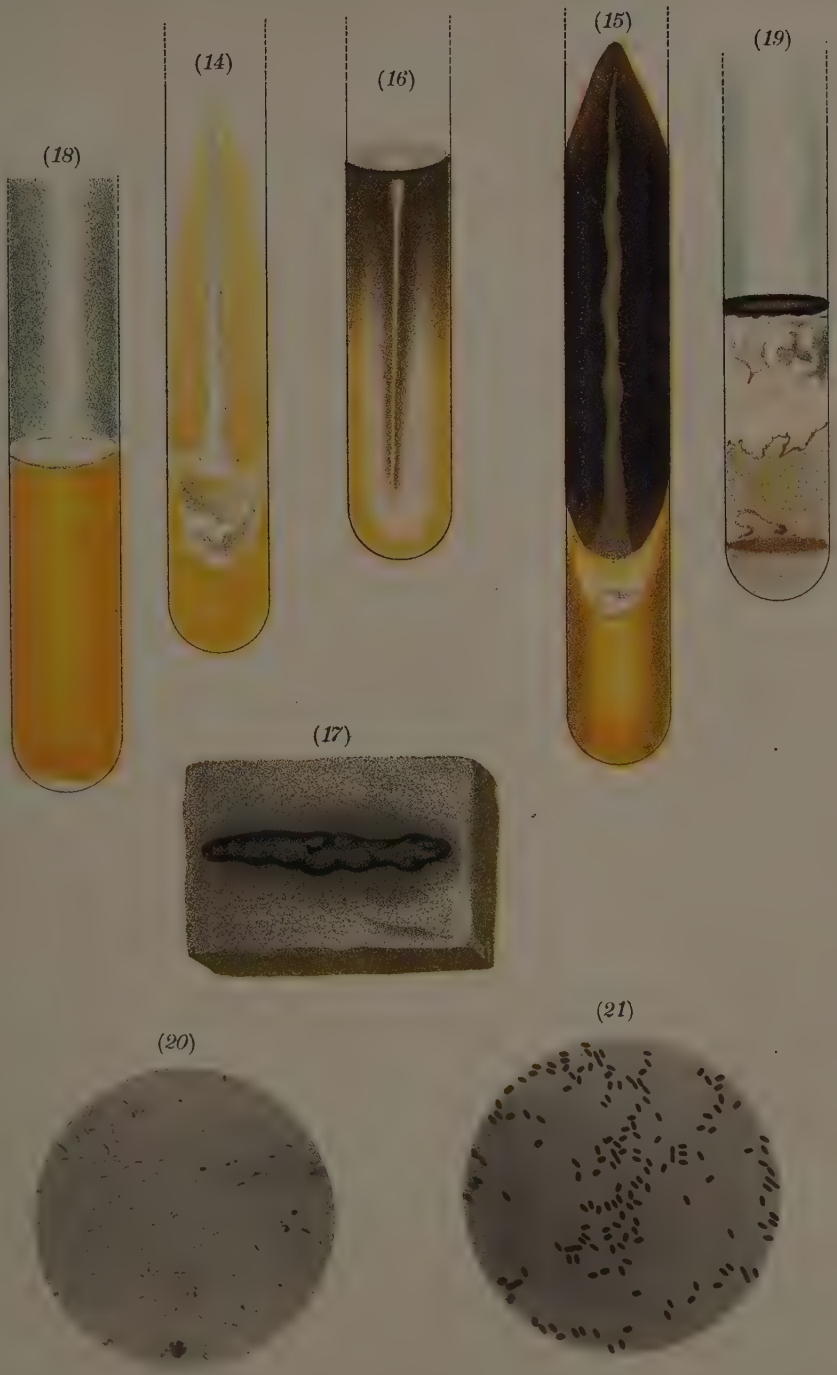


(13)a

(13)b



(11)


(14)
(15)
(16)
(18)
(19)
(17)
(20)
(21)

Ein neuer Nährboden für Bakterienkulturen.

VON

Y. Uyeda.

Eine wertvolle Substanz behufs Diagnose und Charakterisirung von Bakterien ist das Mannan. Dieses Kohlenhydrat ist in den meisten Pflanzen nur in geringer Menge, in einigen pflanzlichen Objekten aber in sehr bedeutenden Mengen enthalten, und zwar kommt es in mehreren Modifikationen vor, in Analogie mit den verschiedenen Dextrinen. Eine Mannan-Modifikation, (A), bildet eine specielle Art Pflanzenschleim, z. B. in den Salepwurzel und in der Hefe; eine zweite Modifikation, (B), bildet beim Kochen eine Gallerte, einem kompakten Stärkekleister ähnlich, besonders ist hier das Mannan der Wurzel der Konyaku-Pflanze[1] Conophallus Konjak (Amorphophallus Rivieri oder Hydrosme Rivieri) zu erwähnen; eine dritte Modifikation, (C), bildet die steinharte Masse der Steinnus, welche weit schwieriger zu hydrolysiren ist, als die ersteren beiden Modifikationen.

Zu meinen Untersuchungen diente das Mannan (B) oder Konyaku-Mannan, welches meist in Form der in Japan käuflichen Gallerttafeln verwendet wurde, um verschiedene Bakterien-Auflagerungen, sowie deren Form und Farbe und Fähigkeit, die Gallerte zu verflüssigen, zu beobachten.[2] Diese Verflüssigung, welche wie ich beobachtete durch verschiedene Bakterienarten herbeigeführt wird, die demnach ein specielles Enzym, Mannase, enthalten, liess sich meist schon bei Zimmertemperatur beobachten,

---

1) Diese Wurzel kommt im gepulverten Zustand im Handel in Japan vor und bildet nach dem Kochen mit Kalkwasser (wobei eine kratzend schmeckende Substanz zerstört wird) einen Nahrungsartikel, der in Form steifer Gallerttafeln verkauft wird.

2) Die gewöhnliche Diastase scheint nicht auf Mannan zu wirken. Da nun das Konyaku-Mannan im menschlichen Darme in Japan verdaut wird, wird wohl Mannase auch zu den Darmenzymen gehören. Kürzlich haben allerdings *C. L. und Mme. Gatin* beobachtet, dass der Pankreassaft verschiedener Tiere das Mannan der Salepwurzel nicht zu hydrolysiren vermag. (Botan. Centrbl. 1905, Sept.)

während für das verwandte Galaktan, den wesentlichen Bestandteil des Agar-Agar, ein entsprechendes Enzym—die Galaktase—in den Bakterien gar nie vorzukommen scheint.[1] Ich habe jedoch auch das Konyaku-Mannan in der gleichen Weise wie es bei Agar oder Gelatine üblich ist, zu Stichkulturen verwendet. Zu diesem Zweck wurde ein Teil Wurzel-Pulver mit 25 Teilen Wasser eine Stunde im kochenden Wasserbade behandelt, dann weiter sterilisirt, wie üblich. Die käuflichen Konyaku-Tafeln aber wurden, sterilisirt, ganz wie Kartoffelschnitte zu den Versuchen verwendet.

STRICHKULTUREN AUF KÄUFLICHEN KONYAKUTAFELN.

Folgende Versuche mit 132 Arten beziehen sich auf deren Entwicklung auf Konyakutafeln bei 16° sowie bei 30°C.

TAFEL I.

(A) Mannan verflüssigende Bakterien.

(a) Auf Agar chromogene Arten.

Art der Bakterien.	Charakter und Farbe der Auflagerung.	Zeit der Verflüssigung des Mannans.	Vergl. mit Agar
Bac. mesentericus niger.	Gute Entwicklung bei 16°; bräunlich weiss, feuchtglänzend.	Allmählich mit Bildung eines Canals.	
Bac. fluorescens liquifaciens.	Ziemlich gute Entwicklung bei 16°, grünlich feuchtglänzend.	Allmählich unter Bildung von Schleim.	
Konyaku Bacillus[2]	Schnelles Wachstum bei 16° mit Bildung eines dunkeln Farbstoffs.	Rasche Verflüssigung und Canalbildung.	Auflagerung farblos.

1) Nur ein von *Gran* beobachtetes Mikrob aus dem Meere, Bac. gelaticus, besitzt die Fähigkeit, Galaktan zu verflüssigen, was biologisch interessant ist, da gerade auch die marinen Algen reich an Galaktan sind. Unter den höheren Pilzen enthält nach *Grüss* Ustilago Maydis ein Galaktan verdauendes Enzym, da Tragant (nicht aber Mannan des Dattelendosperms) gelöst wird. (Botan. Centrbl. 1902, Bd. 31),

2) Verursacht eine Blattkrankheit der Konyakupflanze.

(b) Auf Agar farblose Arten.

Astasia asterosporus.	Nach einer Woche, schmutzigweiss, feuchtglänzend.	Rasche Verflüssigung; der innere Teil der Auflagerung sinkt ein.	
Bac. erythrosporus.	Ziemlich gute Entwicklung, weiss.	Sehr langsame Verflüssigung.	
Bac. leptosporus.	Rasche Entwicklung, schmutzigweiss.	Binnen einer Woche.	
Bac. mesentericus vulgatus.[1]	Grauweisser, runzeliger Belag. Allmählich etwas schleimig werdend.	Allmählich: Auflagerung einsinkend.	
Säurefester Bac. a. Butter Rabinow.	Schmutzigweiss; feuchtglänzende, hohe Auflagerung.	Allmählich.	
Bakterium turgescens.	Ziemlich schnelles Wachstum; schmutzigweiss, rasch sich ausbreitend.	Ziemlich schnell.	
Planosarcina ureae.	Langsames Wachstum; weiss.	Allmählich.	

TABELLE II.

(B) Mannan nicht verflüssigende Bakterien.

(a) Auf Agar chromogene Arten.

Art der Bakterien.	Charakter und Farbe der Auflagerung.	Vergl. mit Agar.
Bac. amyloruber.	Schnelles Wachstum bei 30°; die ganze Tafel wird bald rot.	
Bac. capsulatus roseus.	Ziemlich gute Entwicklung; weiss.	Rosafarbe.
Bac. ferruginosus.	Grünlich, dünn, rasch sich ausbreitend.	
Bac. fuchsinus.	Metallisch glänzend, rotviolett in Scheiben sich ausbreitend, höher in der Mitte.	

1) Vergl. Bul. College Agr. Tokio. Vol. 5, No. 2, p. 260.

Bac. havaniensis.	Ziemlich gute Entwicklung; gelblich.	Rot.
Bac. lactis niger.	Bräunlich, feuchtglänzend.	
Bac. nicotianae.	Weiss, später schwach bräunlich.	Schwarz.
Bac. mycoides roseus.	Schnelles Wachstum bei 16°; schwach rötlich, etwas faltig.	Dunkelrot.
Bac. prodigiosus.	Ziemlich gute Entwicklung; anfangs hellblutrot, später dunkelrot.	
Bac. pyocyaneus Gessard.	Ziemlich schnelles Wachstum; grünlichweiss.	
Bac. pyocyaneus Ernst.	Verbreitet sich schnell über die ganze Oberfläche; bald grauweiss werdend.	Schwach grünlich.
Bac. ruber balticus.	Ziemlich gute Entwicklung; rötlich.	
Bac. ruber plymouthensis.	Sehr dünn, rosafarbig, feuchtglänzend.	
Bac. viridans.	Schnelles Wachstum bei 16°; verbreitet sich binnen 3 Tagen über die ganze Oberfläche, allmählich grünlichblau.	
Bakterium aquatile citreum.	Schön grüne hohe Auflagerung mit Canalbildung.	
Micrococcus agilis.	Ziemlich schnelles Wachstum; fast immer farblos.	Dunkelrot.
Microc. pyogenes aureus.	Ziemlich schnelles Wachstum; weiss, feingranulirt.	
Planosarcina agilis.	Langsames Wachstum bei 16°; sehr schwach rosafarbig.	Dunkelrot.
Pseudomonas phaseoli.	Ziemlich schnelles Wachstum bei 30°; gelblichgrün.	
Sarcina striata.	Schön gelblichgrün, feuchtglänzend, höher in der Mitte.	
Sarcina variabilis.	Ziemlich schnelles Wachstum bei 16°; gelblichgrüne, hohe Auflagerung.	
Sarcina aurantiaca.	Langsames Wachstum bei 16°; schwachgelblich.	Schön orangegelb.
Sarcina citrina.	Schwach gelblichgrün, feuchtglänzend.	
Sarcina erythromyxa.	Langsames Wachstum bei 16° sowie bei 30°; gelblichbrauner, feingranunirter Belag von trockenem Aussehen.	Karminrot.
Sarcina liquifaciens.	Ziemlich gute Entwicklung; schwach gelblichgrün.	

Sarcina mobilis.	Sehr langsames Wachstum bei 16°; gelblich.	
Spirillum rubrum.	Langsames Wachstum; Weiss.	Rötlich.

(b) Auf Agar farblose Bakterien.

Bac. alvei.	Ziemlich gute Entwicklung bei 30°; weiss, feuchtglänzend.	Weiss, später braun.
Bac. angulans.	Sehr langsames Wachstum bei 30°; schmutzigweiss.	
Bac. anthracoides.	Ziemlich gute Entwicklung bei 30°; schmutzigweiss.	
Bac. armoraciae.	Gute Entwicklung bei 16°; schmutzigweiss, rasch sich ausbreitend.	
Bac. atrosepticus.	Sehr langsames Wachstum bei 16°; schmutzigweiss.	
Bac. aerogenes.	Langsames Wachstum bei 30°; schmutzigweiss.	
Bac. Baccarinii.	Schnelles Wachstum bei 16°; feuchtglänzend, schmutzigweiss.	
Bac. bombycis.	Ueppige Entwicklung bei 30°; weiss feuchtglänzend, später braun.	Weiss.
Bac. butyricus.	Sehr langsames Wachstum bei 30°; schmutzigweiss.	
Bac. cereus.	Sehr langsames Wachstum bei 16°; gelblichweiss.	
Bac. Cubonianus.	Schwachgelblichgrün, höher in der Mitte.	Weiss.
Bac. denitrificans.	Ziemlich schnelles Wachstum; schmutzigweiss.	
Bac. Ellenbacchii Caron.	Ueppiges Wachstum bei 16°, sich rasch ausbreitend.	
Bac. d. Flacherie d. Nonne.	Ziemlich gute Entwicklung bei 16°; weiss feuchtglänzend, feingranulirte Auflagerung mit Fortsätzen in der Peripherie.	
Bac. fluorescens longus.	Langsames Wachstum bei 30°; schmutzigweiss.	

Bac. fluorescens albus.	Sehr langsames Wachstum bei 30°; farblos feuchtglänzend, feingranulirt.	
Bac. fluorescens mesentericus.	Langsames Wachstum bei 30°; schwach gelblichgrün.	Weiss.
Bac. mycoides.	Schmutzigweiss, feuchtglänzend, feingranulirt.	
Bac. omnivorus.	Schnelles Wachstum bei 16°; weiss.	
Bac. proteus mirabilis.	Langsames Wachstum bei 16°; farblos.	
Bac. proteus vulgaris.	Langsames Wachstum bei 16°; schmutzigweiss, dünner Belag mit unregelmässigem Rand.	
Bac. ruminatus.	Langsames Wachstum bei 30°; schwach schmutzigweiss, feuchtglänzend.	
Bac. simplex.	Sehr langsames Wachstum bei 30°; schmutziggelblichweiss.	
Bac. typhi murium Löffler.	Langsames Wachstum bei 16°; farblos, allmählich schmutzigweiss.	Farblos.
Mereshkowsky's Mäusetyphusbacillus.	Ueppige Entwicklung bei 16°; gelblichweiss; Belag trocken in der Mitte, aber feuchtglänzend an der Peripherie.	Farblos.
Bac. vermiculosus.	Langsames Wachstum bei 30°; feuchtglänzend, gelblichbraun; Auflagerung allmählich einsinkend.	
Bakterium aquatile griseum.	Ueppige Entwicklung bei 30°; schwach blau, etwas klebrig werdend.	
Bakterium centropunctatum.	Farblos, trockene Auflagerung mit strahligem Rand.	
Bakterium filefaciens.	Farbloser, trockener Belag, von pulverigem Aussehen.	
Bakterium filiforme.	Schnelles Wachstum bei 16°; schmutzigweisser, feuchtglänzender Belag, rasch sich ausbreitend.	
Bakt. Hartlebi.	Schwachbräunlich.	
Bakt. nitrovorum.	Trockener, feingranulirter Belag mit regelmässigem Rand. Schmutzig gelblichweiss.	Weiss.
Bakt. vesiculosum.	Schmutzigweiss, feuchtglänzend.	
Cladothrix nivea.	Schmutzigweisser, feuchtglänzender Belag, höher in der Mitte.	

Clostridium gelatinosum.	Schnelles Wachstum bei 30°; schmutzig-gelblichweiss.
Diplococcus concentricus.	Schmutzig gelblichweiss.
Micrococcus cremoides.	Schmutzigweiss.
Microc. ureae.	Gute Entwicklung bei 16°; farblosen feuchtglänzender ziemlich dicker Belag.
Milch Bacillus Möller.	Ueppige Entwicklung bei 30°; schmutzig-weisser trockener Belag, später faltig.
Tyrothrix turgidus.	Langsames Wachstum bei 30; schwach gelblichgrün.
Bac. pavoninus.	Ziemlich gutes Wachstum bei 30°; farblos.

Die auf Konyakutafeln spärlich sich entwickelnden Bakterien sind folgende:

Bac. aromaticus lactis., Bac. arborescens., Bac. candicans., Bac. cavicida., Bac. cyanogenes., Bac. filamentosus., Bac. denitrificans agilis., Bac. Fitzianus., Bac. fusiformis., Bac. levans., Bac. lucifer., Bac. maidis., Bac. ochraceum., Bac. radicicola v. trifolium pratense., Bac. repens., Bac. roseofluorescens., Bac. ruber indicus., Bac. subtilis., Bakterium aquatile odorans., Bakt. agile., Bakt. Fränkeri., Bakterium Monachae., Bakterium radiatum., Bakt. Stutzeri., Coccobacterium aquae., Micrococcus cinnabareus., Microc. citreus agilis., Micrococ. sulfureus., Microc. tetragenes., Micrococ. viticulosus., Microc. tetragenes ruber., Mikrospira Metschnikowii., Sarcina equi., Sarcina fusca., Vibrio aquatilis fluorescens α & β, Bac. typhosus., Cholera Asiaticae., Bac. anthracis., Vibrio denitrificans., Bac. Pasteurianus., Bac. cyanofluorescens., Sarcina ventriculi.

STICHKULTUREN IN KONYAKUGALLERTE.

Für die Stichkulturen wurde eine Konyakugallerte hergestellt aus 1 Teil feinem Pulver von Konyakuwurzel und 25 Teilen Wasser; in vielen Fällen wurden noch bestimmte Nährstoffe zugesetzt. Die geprüften Bakterienarten waren hier folgende:—

TABELLE III.

(A) Mannan verflüssigende Bakterien.

Art der Bakterien.	Verhalten zu Kanyakugallerte (im Brutschrank bei 30°C)	
	Mit Bouillon.	Ohne Bouillon.
Bac. fluoresc. liquifaciens.	Gutes Wachstum; ziemlich schnelle Verflüssigung; es bildet sich eine fleischfarbige gallertige Haut, und reichlicher Bodensatz; grünfluorescirend.	Langsames Wachstum.
Bac. mesentericus niger.	Ziemlich schnelle Verflüssigung; runzelige Haut.	Schnelle Verflüssigung. Schwachgelblich.
Bac. mesentericus vulgatus.[1]	Gute Entwicklung; schnelle Verflüssigung; es bildet sich eine gallertartige Haut und reichlicher Bodensatz; die Lösung schwach chokoladbraun.	Ueppige Entwicklung.
Astasia asterosporus.	Schmutzigweisse Auflagerung; längs dem Stichcanal entwickeln sich einzelne Gasblasen. Langsame Verflüssigung.	Keine Entwicklung.
Bac. pyocyaneus, Gessard.	Ziemlich schnelle Verflüssigung; es bildet sich grünlichweisse, dünne Haut und reichliches Sediment.	
Bac. viridis.	Schnelles Wachstum; grauweisse feuchtglänzende Auflagerung, welche allmählich einsinkt.	Schnelles Wachstum, aber langsame Verflüssigung; schwach gelblichweiss.
Planosarcina ureae.	Schnelles Wachstum; gelblichweiss, feuchtglänzend; sehr langsame Verflüssigung.	Schlechtes Wachstum.
Konyaku Bacillus.	Ziemlich schnelle Verflüssigung; es bildet sich Haut und Sediment, aber die Lösung bleibt klar.	Rasche Verflüssigung' weiss.

1) Vergl. Bull. Coll. Agr. Tokio Univers. Vol. 5, No. 2, p. 260.

Bac. leptosporus.	Schnelles Wachstum; weiss. Rasche Verflüssigung.	Gute Entwicklung, ziemlich schnelle Verflüssigung, es bildet sich reichlicher Bodensatz und Haut.
Bakterium turgescens.	Schnelles Wachstum; radiäre Auflagerung, dunkelbraun in der Mitte, farblos, feuchtglänzend an der Peripherie.	Gute Entwicklung, ziemlich langsame Verflüssigung, reichlicher Bodensatz.

(B) Mannan nicht verflüssigende Bakterien.

Bac. alvei.	Ueppige Entwicklung; weiss.	Ziemlich gute Entwicklung; weiss.
Bac. bombycis.	Schnelles Wachstum; weiss.	Ziemlich ueppige Entwicklung; weiss.
Bac. acidi lactici.	Schnelles Wachstum; grauweiss, feuchtglänzend.	Sehr langsames Wachstum; weiss.
Bac. coli communis.	Schnelles Wachstum; farblos.	Langsames Wachstum; farblos.
Bac. Cubonianus.	Ueppige Entwicklung; sich über ganze Oberfläche ausbreitend, Häute längs den Glaswänden.	Ueppige Entwicklung; weiss.
Bac. cohoerens.	Schnelles Wachstum; runde glänzende Auflagerungen, gelblichgrauweiss in der Mitte, grauweiss, feuchtglänzend an der Peripherie.	
Bac. capsulatus.	Gute Entwicklung; weiss, glänzend später schmutzig gelblichweiss in der Mitte, aber schmutzigweiss, feuchtglänzend an der Peripherie.	Ziemlich gute Entwicklung; schmutzigweiss.
Bac. filamentosus.	Ziemlich gute Entwicklung; runzelige, an den Glaswänden emporsteigende Auflagerungen.	
Bac. d. Flacherie d. Nonne.	Ueppige Entwicklung; weiss.	
Bac. fluorescens mesentericus.	Ziemlich gute Entwicklung; schwach grünliche dicke Auflagerung; breitet sich schnell aus.	
Milch Bacillus Möller.	Langsames Wachstum; weiss.	
Bac. Nicotianae.	Ziemlich gute Entwicklung; schwach blau, glänzend, später bräunlich.	Langsames Wachstum; schwach bräunlich.

Bac. prodigiosus.	Gute Entwicklung; glänzende, dunkel karmesinrote Auflagerung, allmählich einsinkend.	Ziemlich schnelles Wachstum; schwach rosa Farbe.
Bac. repens.	Ueppige Entwicklung; weiss.	Schlechte Entwicklung.
Bac. radicicola v. Pisum sativum.	Langsames Wachstum; weiss.	
Bac. typhi mur.	Schnelles Wachstum; weiss, später gelblichweiss, breitet sich schnell aus.	Schlechte Entwicklung.
Bac. vermiculosus.	Schnelles Wachstum; schwach blau, feuchtglänzende Auflagerung, später dunkelbraun in der Mitte.	
Bakterium agile.	Ueppige Entwicklung; farblos.	Schlechte Entwicklung.
Bakterium denitrificans.	Schnelles Wachstum; weiss.	
Bakterium filefaciens.	Schnelles Wachstum; entwickelt Gasblasen im Stichcanal; schwach gelblichweisse, glänzende Auflagerung, allmählich einsinkend in der Mitte, mit strahligem Rand.	
Bakterium filiforme.	Schnelles Wachstum; entwickelt Gasblasen; weisser trockener Belag, allmählich schmutzigweiss werdend, grauweiss an der Peripherie.	
Bakterium Hartlebi.	Langsames Wachstum weiss	
Bakterium nitrovorum.	Schnelles Wachstum; rosenkranzähnliche Auflagerung dunkelfärbig in der Mitte, aber weiss an der Peripherie.	
Bakterium Stutzeri.	Langsames Wachstum; weiss.	
Bakterium der seifigen Milch.	Gedeiht ueppig auf der Oberfläche sowie im Stichcanal; grauweiss.	
Micrococcus citreus agilis.	Schnelles Wachstum; schwach gelblichgrüner Belag.	
Micrococcus ureae.	Ziemlich gute Entwicklung; weiss, glänzend und gelatinös.	
Planosarcina agilis.	Langsames Wachstum; weiss, später schwach rot.	
Sarcina citrina.	Schnelles Wachstum; Belag mit zackigem Umriss, allmählich einsinkend; dunkelbraun.	
Sarcina erythromyxa.	Langsames Wachstum; feingranulirt Belag, gelblichgrün später dunkelnd.	Sehr langsames Wachstum; weiss.
Sarcina meliflava, Sarcina striata.	Langsames Wachtum; gelblichgrün. Ziemlich gute Entwicklung; gelblich.	Langsames Wachstum; gelblich.

Über die Bactericide Wirkung des Phenylpropiolsauren Natrons.

VON

Y. KOZAI.

Es war seit lange das Bestreben der Aerzte, eine Substanz zu finden, welche mit stark bactericiden Eigenschaften begabt und doch zugleich möglichst unschädlich für tierische Zellen wäre. Wenn wir mehrere Sera und die Pyocyanase ausnehmen, so sind solche Substanzen kaum bekannt. Doch scheint das phenylpropiolsaure Natron, wenigstens bis zu einem gewissen Grade, jener Anforderung zu entsprechen. Die Beobachtungen von *Bulling* in Reichenhall [1], dass tuberculöse Affectionen, mit Lösungen dieses Salzes behandelt, bedeutend reducirt wurden, ohne schlimme Nebenerscheinungen hervorzurufen, war der Grund, dass ich das Verhalten verschiedener Bacterienarten zu diesem Salze prüfte.

24 stündige Bacterienkulturen in Bouillon wurden mit der in Reagenzröhrchen enthaltenen sterilen Loesung von phenylpropiolsaurem Natron von verschiedenen Concentrationen sehr rasch aber gründlich vermischt.[2] Die so hergestellten leicht trüben Aufschwemmungen wurden nach gewissen Zeitintervallen in üblicher Weise mit Nährgelatine zu Platten in Petrischälchen verarbeitet. Diese Platten sowohl wie auch die Reagenzröhrchen, welche den Gelatinerest enthielten, wurden, wie sich von selbst versteht, vor Infection bewahrt. Die Kolonienzählung ergab die folgenden Ergebnise :

---

1). Münchner Medicin. Wochenschrift. 1904 u. 1905.

2). Diese nnd die folgende Operationen müssen möglichst schnell ausgeführt werden, sonst werden die Bacterien besonderes von stärkeren Lösungens jenes Salzes inzwischen zum Theil getötet oder so geschwächt, dass sie nicht mehr sich entwickeln können.

TABELLE I.

Zahl der Kolonien[1]

Bakterienarten	Gleich nach dem Mischen			Nach 3 Stunden			Nach 24 Stunden		
	1%	3%	5%	1%	3%	5%	1%	3%	5%
Bacterium coli	755	620	516	630	261	0	505	5	0
Bacillus pyocyaneus.	696	630	320	510	4	0	260	0	0
„ subtilis	679	505	382	576	32	20	27	19	16
„ typhi	507	309	170	501	2	0	154	0	0
Vibrio cholerae	935	650	98	50	0	0	0	0	0

TABELLE II.

Zahl der Kolonien[2]

Bakterienarten	Gleich nach dem Mischen		Nach 3 Stunden		Nach 24 Stunden	
	1%	3%	1%	3%	1%	3%
Bacillus aerogenes	372	165	369	0	356	0
„ Capsulatus	412	130	109	0	23	0
„ cyanogenus	489	326	0	0	0	0
„ denitrificans	212	120	2	0	0	0
„ flacherie d, Nonne	184	262	2	2	0	0
„ fluoresc. liquefaciens	524	472	55	0	0	0
„ mycoides	247	256	208	237	276	193
„ prodigiosus	387	103	52	0	22	0
„ typhi murium	516	458	227	0	0	0
Proteus mirabilis	1153	1216	111	0	0	0
„ vulgaris	711	667	106	0	0	0

1). Die Zahlen repräsentieren den Durchschnitt von 4 parallelen Versuchen.
2). „ „ „ „ „ „ 3 „ „

Das phenylpropiolsaure Natron hatte also in 1 procentiger Lösung bei Vibrio cholerae, Bacillus cyanogenus, B. capsulatus, B. denitrificans, B. flacherie der Nonne, B. fluoresc. liquefaciens, Proteus mirabilis und Proteus vulgaris eine stark bactericide Wirkung in 3 Stunden. Bacterium coli, Bacillus pyocyaneus, B. typhi, B. aerogenes und B. typhi murium sind gegen jene Concentration verhältnissmässig widerstandsfähig. In stärkeren Lösungen war die Wirkung natürlich grösser. Die Verminderung der Kolonienzahlen mit steigender Concentration der Lösung auf, 3, resp. 5% lässt erkennen, dass schon während der Herstellung der Aufschwemmung eine grosse Anzahl der eingetragenen Bacterien in der Regel vernichtet wurde. Sporenbildende Bacterienarten sind aber in Folge der Anwesenheit von Sporen selbst nach 24 stündiger Einwirkung einer 3 procentigen Lösung noch entwickelungsfähig. Bei B. subtilis war selbst nach 24 Stunden langer Einwirkung einer 5 procentigen Lösung dieses noch zu beobachten.

Ausser diesen Versuchen wurden noch andere angestellt mit weit verdünnteren Lösungen der Natronsalze von Phenylpropion-, Zimmt- und Phenylpropiolsäure. Hierbei ergab sich, dass eine 0.15 procentige Lösung des phenylpropionsauren Salzes in Bouillon das Wachstum verschiedener Bacterien ebensowenig verhinderte als eine ebenso starke Lösung von zimmtsaurem Natron, dass beide diese Salze meistens aber etwas hemmend wirkten im Vergleich zum phenylessigsauren Natron. Die Wirkung des phenylpropiolsauren Natrons war sher verschieden je nach Bacterienarten. So wirket dieses Salz auf B. aerogenes und Proteus vulgaris mehr entwickelungshemmend als das zimmtsaure Natron; bei B. subtilis und B. mesentericus vulgatus war das Umgekehrte zu beobachten.

Die giftige Wirkung des phenylpropiolsauren Natrons beruht einerseits auf der Phenylgruppe, andererseits auf der dreifachen Bindung. Diese Giftwirkung musste noch erhöht werden, wenn statt der Carboxylgruppe eine Aldehydgruppe vorhanden ist.

$C_6H_5-CH_2-CH_2-COOH$	Phenylpropionsäure
$C_6H_5-CH=CH-COOH$	Zimmtsäure
$C_6H_5-C\equiv C-COOH$	Phenylpropiolsäure

$C_6H_5-C\equiv C-C\begin{matrix}O\\H\end{matrix}$ Phenylpropiolaldehyd oder

Phenylpropargylaldehyd

Dieser Aldehyd[1] ist aber einerseits sehr leicht veränderlich, er oxydiert sich leicht an der Luft, andererseits ist er so schwer in Wasser löslich, dass eine genaue Dosirung nicht gut möglich ist. Es ist nötig, zuerst eine alkoholische Lösung von bestimmtem Gehalt herzustellen und von dieser kleine Mengen zur Nährbouillon zu geben. Auf diese Weise konnte ich feststellen, dass eine 0,04 procentige Lösung dieses Aldehyds und des Zimmtaldehyds auf folgende Bacterien entwickelungshindernd wirkten: B. capsulatus, B. cyanogenus, B. mesentericus ruber, B. mesentericus vulgatus, B. mycoides, B. prodigiosus, B. pyocyaneus, B. subtilis, B. typhi murium, B. Zopfii, Proteus vulgaris und P. Zenkeri[2]—Bei B. aërogenes, B erythrosporus, B. Megatherium, B. Plymouth und Sarcina aurantiaca wurde jedoch die Entwickelung nicht verhindert.

Bei 0.03% war die bacterienfeindliche Wirkung jener Aldehypde schon weit schwächer.

---

1). Dieser Aldehyd wurde von zwei Jahren von *Claisen* dargestellt, welcher die Güte hatte, uns eine Probe zu senden.

2). Bei den Controlversuchen mit der Bouillon unter Zusatz von gleichen Mengen von Aethylakohol, als in den obigen Versuchen vorhanden war, zeigten diese Bakterienarten ein üppiges Wachstum,

Smut on Cultivated Large Bamboo (Phyllostachys).

BY

S. Hori.

Introduction.

In 1894, Mr. *Y. Tanaka* sent to me from the province of Mino some specimen of smutted branches of Hachiku-bamboo (Phyllostachys puberula *Munro*) inquiring after the nature of the disease and its prevention. As far as I know, the smut on bamboo has heretofore been not reported, neither in Japan nor elsewhere, and the specimen mentioned had been kept since in the herbarium of our Station bearing the unpublished herbarium name "Cintractia Bambusae *Miyabe et Hori*" as other work prevented me to investigate the matter. Since that time I received annually further specimens of branches attacked by the same disease not only on Hachiku-bamboo, but also on Madake-bamboo (Phyllostachys bambusoides *Sieb. et Zucc.*) from many of my friends and bamboo-growers from several provinces of Japan. I, myself had also occasion to observe the disease in several localities, especially in the warmer region of Japan.

The smut bamboo is known by the local name of "Susu" (soot) among the bamboo-growers in the prov. Harima. It is also known by the name of "Jinengo" (wild rice) in the prov. Mino, as it resembles somewhat to the fructifying branches of bamboo, called also wild rice. This serious disease leads to the death of the entire bamboo forest. It is reported that the flowering of bamboo takes place after 60 years of existence and this is mentioned also in several Chinese and Japanese books of natural history and in monographs on bamboo; but we found nowhere an account about the smut.

In 1900, Prof. Dr. *P. Hennings** of Berlin described a smut on a

* *P. Hennings*, Fungi japonici I. *Engler's* Bot. Jahrbüch. 28 Bd. 3 Heft. 1900. p. 260.

Japanese wild low bamboo (Sasa ramosa *Makino et Shibata*) collected by Prof. Dr. *M. Shirai* in Nikko, and he gave the scientific name Ustilago Shiraiana as a new species ; the descriptions is as follows :

Soris in ramis junioribus, eos deformantibus et incurvantibus, primo epidermide pallida tectis, dein pulverulentis, atro-olivaceis; sporis subglobosis v. ellipsoides, pallide olivaceis v. fuscis, levibus, $4—7 \times 3\frac{1}{2}—6\ \mu$. Hab. in ramis junioribus Bamboo Veitchii, Nikko Japoniae (*Shirai*).

By comparing the description of U. Shiraiana *Henn.* and the specimen C. Bambusae *Miyabe et Hori*, they do not agree in regard to the shape and size of spores and in some other characters.

In the beginning of the last year, Dr. *G. Yamada*, professor of the Morioka Higher Agricultural and Dendrogical School, kindly sent to me a good specimen of smut on wild low bamboo (Sasa paniculata *Makino et Shibata*) which bears the name of U. Shiraiana; and at almost the same time I received this same smut collected in the prov. Mutsu by Mr. *N. Nambu*. In May when I was travelling in the mountainous region of the prov. Kai, I also found fortunately the same smut on wild low bamboo (Arundinaria Simoni *Riv.* var. Chino *Makino et Shibata*.)

By comparing these three samples of smut and that on the cultivated large bamboo, it became clear that these smut fungi are quite similar, but they do not agree in the descriptions with U. Shiraiana on the points already mentioned.

Hence I consulted Prof. Dr. *M. Shirai* in the Agricultural College of the Tokyo Imperial University to get his original specimen of U. Shiraiana for deciding the question of what kind of Japanese bamboo smut Prof. *P. Hennings* described as U. Shiraiana.

By comparing the smut fungi of the various kinds of bamboo at present in my hand, it appears that they are all identical, while at the same time, it became clear that in *Hennings'* descriptions of U. Shiraiana there are some defects which undoubtedly are due to his observations on some old and dry specimens.

In Japan the several kinds of bamboo, both cultivated and wild, are of large economic use ; hence the study of bamboo smut is of great importance.

The following contains the result of identification of smut fungi on cultivated large bamboo and U. Shiraiana together with the germination of spores.

Symptoms of the Disease.

The disease always occurs on the younger internodes and growing points of branches, and it appears also that the disease may occur whenever the surrounding conditions be favorable from the time when the spring buds burst until the growth of the branches ceases. Accorning to the degree of development of the branches when attacked, the symptoms of the disease are divided into two categories in which the extent of damage may naturally differ.

When the young short branches still covered by the leaf-sheathes and bracts, that is the elongated buds, be attacked, they assume at first a somewhat swollen and stouter form, and since no particular deformations or appearances externally are noticeable common observers will suspect no disease. (Pl. IX. fig. 1., Pl. XI. fig. 1.)

Such diseased branches seem generally to stop their further growth, while the smut fungus is continuing the spore formation. Finally the leaf-sheathes and bracts, the external coverings of the buds, begin to open and die off, and the smutted internodes and growing points covered with brownish powder of smut spores make their appearance from inside. (Pl. IX, X, XI. fig. 2.)

The smut is restricted to the internodes and growing points of young branches, and often on the lower part of the young leaf-sheath. By the slight prolongation of the infested internodes, the growing points and uppermost part of internodes are pushed upwards, while the latter are still covered closely by the bracts and leaf-sheathes. The affected parts become wrinkled or bent to one side showing numerous lateral folds.

When most of the young branches are affected by the smut, the winter buds or undeveloped spring buds soon after begin to develop. In a certain stage of development, the numerous diseased and healthy branches crowded on certain spots of the old branches give the impression of hexenbesen.

Since this formation somewhat resembles flowered branches, it is mistaken by the growers as a sign of the "Jinengo-disease" (Pl. X. fig. 1)

The symptoms thus far mentioned are commonly observed on the young branches not more than 3 or 4 centimeters in length, which is the case in the latter part of May or the beginning of June, according to the temperature of the localities and the rain fall.

As far as my observations go, the second new branches are commonly free from the smut, but they might possibly be affected by the disease also, if the surrounding conditions would be favorable, because the disease may occur late in July or even in August on the upper part of branches of considerable length; about the latter form of smut I will explain hereafter.

While short branches show the infection all over, the long branches show it only on the growing points and upper internodes, since their lower internodes have hardened; branches of 15—18 cm. length show this condition frequently, the lower 10—12 cm. being entirely free from smut (Pl. XI. fig. 3)

Such cases are commonly met with in July or August. The smut on wild low bamboo in most cases has the symptoms just mentioned (Pl. X. fig. 3)

The deformations of the upper portion of the long branches resemble those of the young smutted branches. The winter buds on unaffected internodes of branches smutted on the upper part are often accelerated in their development.

Commonly the smut spreads over all of the branches of a single stock of bamboo and cases are not rare that a large forest is entirely infested. Sometimes, however, it is restricted to certain branches only and in some cases I observed, that the smut is restricted to the bamboo growing on the outskirts of a forest. When once the smut has invaded a forest, the disease will show more or less annually though the degree differ according to the weather.

Conditions Favorable for the Disease.

It is reasonable to suppose that the smut on bamboo had been present

more or less somewhere in Japan already at some remote time, though we can not find any record. It may also be possible that the smut formerly has been too rare to arouse the attention of the bamboo-growers until about ten years ago.

As a matter of fact the demand for bamboo is gradually increasing year after year for the manufactures of house utensils and other objects, for building materials of houses and fences, and it is also largely used for the protection of river banks. This increased demand for bamboo has induced the culture of bamboo forest everywhere and the growers pay now much more attention to their bamboo forests than foremerly, which is also the reason why the occurrence of the smut is reported by many growers. Secondly, the increase of bamboo forests facilitates again the spreading of the smut fungi.

According to the symptoms of the disease, the occurrence of smut has a close relation to the rain fall and wind at the time of the development of the attacked branches. The restriction of smut to the upper part of the longer branches shows really such a relation.

Though my observations were limited to some localities, the following facts may also prove this. In 1902, the rain fall had continued about three weeks between May and June; so that I had postponed my departure until the 5th of June. During this journey lasting four weeks in the prov. Omi, Bizen, Aki and Sanuki, I have met with severely smutted bamboo forests everywhere.

The wind is a principal factor of transporting the spores for the propagation of and natural infection by the smut. Since the branches of bamboo growing on the outside of the forest are much more smutted than the inner, a relation to the wind becomes evident.

The relations to manuring and to the influence of the moisture of the soil are not yet clear. The bamboo growing on unmanured dry sandy banks of rivers or on hill-sides are just as well attacked, as that growing on fertile soil.

Damages and Distribution.

When most of the young branches are severely attacked by the smut,

the growth of the bamboo stocks is greatly disturbed and death results. The affected stems became brittle whereby the value is greatly reduced, or the stems may even become entirely useless for certain purposes. The smut disease of bamboo causes therefore great damage to the growers who are as much afraid of this dreadful plague as of the flowering of the bamboo, which also causes the death of the plants.

But when the upper elongated branches alone are attacked the effect on the further life of the bamboo is not directly perceivable.

The smut has been found on several kinds of bamboo, both cultivated and wild, throughout the empire. In the warmer regions where the large bamboo (Phyllostachys) is widely cultivated, the smut is found only on cultivated bamboo, and was not yet found on wild bamboo; while in the northern cold climate, the smut occurs merely on wild low bamboo.

At present, the smut is known to occur on the following four species of bamboo, namely: Phyllostachys bambusoides *Sieb. et Zucc.*, P puberula *Munro*, Sasa ramosa *Makino et Shibata* and Arundinaria Simoni *Rit.* var. Chino *Makino et Shibata*; the former two species are cultivated and thrive well in the warmer region, while the latter two species are entirely wild low bamboo, growing on road side or hills in the northern regions.

It is peculiar that the smut is not yet found on Moso-bamboo (Phyllostachys mitis *Rit.*) though the allied species of Hachiku and Madake-bamboo are largely cultivated side by side with the latter.

I fear the smut would some day in future be found also on the Moso-bamboo and also on numerous other wild species.

Smut Fungi.

The smut fungus after penetrating into the tissues of the growing points, internodes and also the lower part of leaf-sheath of the young branches, begins to form the spores on their surface; by the gradual increase in number and the maturation of the spores, the leaf-sheathes and bracts which still cover closely the outer part of the affected branches are pushed out and in opening widely the deep brownish spore-masses are brought to light.

In scraping off the leaf-sheathes and bracts of the affected branches in the earlier stage in which practically no external particular appearance of disease is noticed, we can perceive the faintly brown colored surface, with here and there some small brown spots, of the growing points and internodes. These brown spots are the portions where the spores matured a little earlier than on others.

A cross section of the affected internodes under the microscope shows the presence of mycelium running throughout the tissue, and on the surface of the internodes the spores of different size and color are seen in chain-like arrangement. It is of special importance to notice that the ruptured epidermis of the host in the smutted part is not perceivable, though Prof. Dr. *P. Hennings* wrote "Primo epidermide pallide tectis" in his description.

Indeed, the epidermis of the host when infested by the smut fungus is very young and not yet fully differentiated. *Hennings* so called overlapping epidermis are no doubt, the dead leaf-sheathes and bracts and not the true epidermis of the host.

The matured spore-masses are deep brown in color and light and pulverulent in texture. The spores are easily blown away by the wind or washed down by the rain, after the coverings of the bracts are opened.

Under the microscope the spores appear mostly spherical, sometimes subglobose or elliptical, and they are almost uniform in the shape in different specimens; light olivaceous or sometimes light brown in color; contents finely granular with often one or two oil globules at the center; epispore rather thin and smooth, $5.5-11=5.5-12$ μ large, but $6-9=6-10$ μ is the most common size.

About the shape and size of spores, my observation differs somewhat from that of Prof. *P. Hennings*. But this contradiction was fully solved after my observation on the *Hennings* original specimen, which Prof. *M. Shirai* kindly sent to me for comparison, and the fresh specimen of the same smut fungus on the same host. It has become clear that *Hennings* has observed

the smut of a comparatively old dry specimen in which the spores were mostly shrunk and reduced in size.

In fresh or comparatively recent specimen, the spores are mostly spherical and those of subglobose or elliptical form as *Hennings* described, are rather rare. The spores commonly attain the size of about 6—9=6—10 μ; hence they are much larger than those described by *Hennings*, while in general the smut spores on Phyllostachys are comparatively larger than that on Sasa and Arundinaria. The latter fact is a common phenomenon on the numerous other parasitic fungi and it is of no value for separating the species on the systematic standpoint, because the other characters viz. shape, color, germination etc. are quite similar.

The following is the measurement of the size of the spores taken at random from the different specimen and the host.

Specimen.	Size of the spores in μ.		
	7×7	6×6	6×6
	7×7	8×9	7×9
	7×7	6×8	8×8
	8×8	7×7	6×7
	6×6	7×8	6×6
On Arundinaria Shimoni *Kit.*	7×8	8×8	7×7
var. Chino *Mak. et Shib.*, Prov.	8×10	8×8	6×6
Yamanashi, (*S. Hori*).	6×6	8×8	8×8
	7×8	6×6	7×8
	6×7	6×7	8×8
	8×8	7×8	6×7
	6×6	8×8	6×7
	7×7	6×6	8×9

Specimen.	Size of the spores in μ.		
On Sasa ramosa *Mak et Shib.*, Prov. Aomori (*N. Nambu*).	6×7	7×8	8×8
	7×7	7×8	7×7
	7×7	6×6	6×6
	8×8	8×8	8×8
	7×7	7×7	6×7
	7×8	8×8	7×8
	6×6	6×7	7×7
	6×6	7×7	6×6
	5·5×6	7×8	8×8
	6×6	8×8	8×8
	7×7	6×6	9×9
	7×8	7×7	6×6
	7×7	8×8	6×6
On Sasa ramosa, Prov. Morioka (*G. Yamada*).	7×8	6×6	7×7
	8×8	6×6	6×8
	6×7	6×6	6×6
	7×7	8×8	5·5×7
	6×6	5·5×5·5	7×7
	7×8	8×8	8×8
	7×8	7×8	7×8
	6×8	8×8	6×7
	6×6	8×9	6×8
	8×8	6×6	7×8
	8×8	6×6	8×8
	7×8	8×8	6×6

Specimen.	Size of the spores in μ.		
On Phyllostachys puberula *Munro*, Prov. Mino, (*Y. Tanaka*).	8×8	9×9	9×9
	9×9	8×8	7×8
	7×8	9×9	8×8
	7×8	9×9	8×8
	8×8	9×9	9×9
	8×8.5	7×8	7×8
	9×9	7×8	8×9
Yamato specimen (*B. Nakano*).	8×10	10×10	10×10
	6×7	10×10	9×10
	9×9	8×9	9×10
	10×10	8×10	8×8
	8×8	9×9	8×9
	10×10	7×8	9×9
	7×8	7×8	10×10
	8×9	8×9	10×10
Tokio specimen (*T. Makino*).	8×9	8×8	6×9
	7×7	8×9	7×8
	7×7	9×9	8×8
	8×8	8×8	8×8
	8×8	8×8	8×9
	6×7	6×7	8×8
	8×8	6×7	7×8
Tokio specimen (*S. Hori*).	8×10	10×10	8×9
	8×8	10×10	9×9
	9×9	9×10	9×10
	7×10	9×9	8×8
	8×8	9×11	10×10
	10×10	9×9	8×8
	8×9	8×8	8×9

Specimen.	Size of the spores in η.		
Yamato specimen,* (*T. Jinno*).	11×11	9×6	10×10
	10×11	10×10	10×10
	8×10	8×9	10×10
	10×10	8×8	10×10
	10×10	8×9	10×11
	10×10	10×10	10×12
	10×10	10×10	8×9
On Ph. bambusoides *Sieb et Zucc.*, Prov. Harima, (*K. Watanabé*).	8×8	9×9	8×8
	8×9	9×9	6×7
	9×7	9×9	9×9
	8×8	7×8	9×9
	10×10	7×7	8×9
	7×7	10×10	7×7
	8×8	7×7	6×7
	7×8	9×10	8×9
Kaga specimen (*R. Taniguchi*).	8×9	9×9	8×8
	8×9	7×8	8×8
	8×9	9×9	8×8
	8×9	8×8	8×9
	7×8	8×8	8×9
	8×8	9×9	8×9
	7×8	8×10	9×9
	8×9	8×8	9×10

Germination of Spores.

Before entering into the details of the germination of the spores, it is important to notice the methods of culture carried on. The materials were always chosen from the fresh specimen, and the spores for germination were

* In this specimen spores are much larger and pale olivaceous in color.

taken by means of a sterilized platinum needle from the smutted portion of bamboo branches, where the spore-masses were still covered by the leaf-sheath, in order to avoid the admixture of foreign impurities. By this precaution, I have succeeded in most cases in the culture of the spores in an almost pure condition.

For the germination of the spores, I have used the hanging drop culture with the *Van Tieghem* cell of ½ cm. high and 1½ cm. of inner diameter, and the slide of the hollow place at the center. The cells and slides were sterilized previously and the former was fastened to the latter by vaseline.

The sterilized distilled water used for the germination of the spores was dropped on the surface of the sterilized cover glass by means of a platinum needle, and after the spores were sown into the water, the cover glass was kept inverted over the cell to which it was fastened with vaseline. But in most cases the spores were not sown directly into the water, they were first sown thinly on the dry surface of a cover glass, and the latter was then inverted over the cell into which a few drops of water previously were poured. After a few hours some vapour condenses on the spores of the cover glass, and thus almost the same condition was reached as in directly sowing the spores into the water. Indeed, for the continued observation on the growth of certain spores, the latter method is of much more convenience.

As a culture medium a 10 % solution of the Japanese ame* was principally used. The bouillion sometimes used was prepared after the formula ordinarily followed by bacteriologists; but it accelerated the growth of bacteria and greatly retarded the germination of the smut spores. Aside from this defect there was no apparent advantage compared with the ame solution. The modified *Cohn* solution was also used, but the result was practically the same as with the ame-solution.

Throughout the work the greatest care was taken to preserve the cultures free from contamination of any sort. Unless otherwise stated, the cultures were kept in a light-proof thermostat at a temperature of 25°±C.

Germination in water: the fresh spores germinate readily within 10 hours, a spindle shaped promycelium protruding, which when attaining the

*Ame is a transparent semi-fluid of sweet taste made from malt of rice or millet.

full growth, becomes a single septated long spindle or cylindrical form 3½ μ in breadth and 20—22 μ in length with numerous vacuoles, and the lower younger portion of the promycelium forms what *Brefeld* calls a knee to which the upper portion of the promycelium is attached. Rarely the secondary promycelium is protruding from one side of the knee ; it finally attains the same form as the primary promycelium.

The detached promycelium produces one or two sporidia at the septum or the end, which may be detached or not and will develop to the same form as the primary promycelium ; but in the most cases, the sporidia are developed into the slender long hypha.

Germination in a nutrient solution : almost the entire number of the spores sown have germinated within a few hours and each produces a long spindle or cylindrical promycelium which apparently does not differ in shape from that formed in water. But the germination of spores in a nutrient solution compared with water, is far more vigorous and luxuriant, and the full grown promycelium attains 3—5 μ in width and 20—36 μ in length, commonly 4 and 28 μ.

In 20—24 hours, while the primary promycelium still is attached to the knee, the secondary promycelium begins to make its growth from the knee, and in the next 24 hours both, the primary and the secondary promycelium, are septated by one or two cross partitions, and often a third promycelium is produced. The full grown promycelium is easily detached and produces sporidia on the apex or near the septum. Often two continuous segments of a detached promycelium may become united by the knee-joint fusion which finally produces one sporidium after developing to some length.

When the detached promycelium is removed into a fresh nutrient solution, it makes a more vigorous growth, increasing in length and breadth, and forming many septa. In this case mostly 3 sporidia are produced directly at the end, and directly or indirectly by a kind of sterigma at the septa. These sporidia soon develop again into the ordinary form of septated promycelium, and the latter being easily detached repeats the growth as above described when the nutrients in the culture medium are not exhausted or when they are removed into a fresh nutrient solution.

Throughout the numerous culture experiments with both water and nutrient solution, the formation of aërial conidia has not been observed.

Though it is not yet shown experimentally in what way the infection by the present smut fungus takes place, it might be possible to consider that the sporidia produced on the promycelium of the spore, which escaped by the wind or the rain from the smutted branches in the preceeding season or year into the ground in the vicinity of the bamboo forest, are brought in contact with the young soft branches by the wind, and after obtaining the proper moisture, the germinated sporidia make their entrance into the soft tissues of the branches by means of the germ-tube.

From the mode of germination of the spores, it appears that the present smut fungus belongs decidedly to the Hemiustilago *Brefeld.**

As a result of the study of this smut fungus, we are forced to make some changes in the original description of Ustilago Shiraiana *Henn*, as follows:

USTILAGO SHIRAIANA *P. Henn.*

Fungi jap. I. *Engler's* Bot. Jahrbüch. 28 Bd. 3 Heft. p. 260. 1900; *Sacc.* Syll. Fung. XVI. pars V. p. 369. 1902; *Ideta* Lehrbuch. d. Pflanzenkrankh. (japanisch) p. 156. 1903; *Omori et Yamada* Pflanzenpath. (japanisch) p. 251. 1904.

Produced on the growing points and internodes of the young branches, causing often deformation or distortion; spore-masses at first covered by the leaf-sheath and bracts, pulverulent, deep brown; spores spherical, sometimes snbglobose or elliptical, the rounded ones 6—10 μ. in diameter, and the elongated ones 5.5—10=6—12 μ. in size.

Epispore light olivaceous, smooth; contents finely granular with some oil globules; promycelium cylindrical or long fusiform, pedicellated, 1—2 septated, evanescent; sporidia terminal and lateral, long fusiform or elliptical, develop into the new promycelium.

Hab. on Phyllostachys puberula *Munro* Prov. Musashi (*T. Makino* May 1894), Prov. Mino (*Y. Tanaka* July 1894), Prov. Harima (*K. Watanabe* May

* *Brefeld*, Untersuch. a. d. Gesammt. d. Myk. XII Heft, p. 218 1895.

1900), Prov. Idzumo (*F. Tanaka* June 1900), Prov. Harima (*K. Watanabe* May 1901), Prov. Idzumo (*F. Tanaka* May 1902), Prov. Bingo (*S. Hori* June 1902), Prov. Yamato (*S. Nakano* July 1902), Prov. Bitchu (*Z. Shō* July 1902), Prov. Idzmi (reg? June 1904); Ph. bambusoides *Sieb. et Zucc.* Prov. Yamato (*T. Jinno* July 1897, Prov. Harima (*K. Watanabe* May 1900), Prov. Kaga (*R. Taniguchi* June 1900), Prov. Musashi (*S. Hori* August 1900), Prov. Sanuki (*S. Hori.* June 1902), Prov. Awa. (*S. Hori.* June 1904); Sasa ramosa *Makino et Shibata* Nikko Prov. Shimotsuke (*M. Shirai* June 1899), Prov. Rikuchu (*G. Yamada* June 1903), Prov. Mutsu (*N. Nambu* June 1903); Arundinaria Simoni *Riv.* var Chino *Makino et Shibata* Prov. Kai (*S. Hori* May 1904), Prov. Musashi (*N. Nambu* May 1904).

Prevention.

It is a matter of high importance that the smutted branches which are still covered by the leaf-sheath, that is before the spore-masses are scattered away by the opening of the leaf-sheath, should be cut off and burnt. The continuous careful removal of the immature smutted branches may possibly reduce the damages.

Since the smut on Sasa and Arundinaria growing on the road sides or hills and that on the cultivated Phyllostachys is identical, it is also important to take off the smutted branches on Sasa and Arundinaria growing near the vicinity of a Phyllostachys forest.

Spraying with Bordeaux mixture, at the time when the spring buds just begin to develop, should be beneficial. Sprinkling of lime on the ground of the bamboo forests after clearing it from the defoliated leaves just before the spring buds burst, should also be effectual to some extent.

I am indebted to Mr. *T. Makino* for the identification of the species of bamboo prepared to the specimen, and to Prof. Dr. *M. Shirai*, Dr. *G. Yamada*, and Mr. *N. Nambu* and many others for kindly supplying me with the specimens.

Explanation of Figures.

Plate IX.

Fig. 1. Earlier stage of the smutted branches of Phyllostachys puberula *Munro* still covered by the leaf-sheathes and bracts. The specimen collected by Mr. *T. Makino* May 6, 1894 at the vicinity of Tokio.

Fig. 2. Later stage of the severly smutted branches of Ph. puberula *Munro*. Osaka specimen colected June 13, 1904.

Plate X.

Fig. 1. Smutted and flowered branchlets on the same branch of Ph. bambusoides *Sieb et Zucc.* The specimen collected by Mr. *K. Watanabe* May 20, 1900 in the Prov. Harima.

Fig. 2. Smutted branches of Sasa ramosa *Mak. et Shib.* The specimen collected by Dr. *G. Yamada* June 21, 1903 at Morioka in the Prov. Rikuchiu.

Plate XI.

Fig. 1. Earlier stage of the smutted spring branches of Ph. puberula *Munro*; the spore-masses are still covered by the leaf-sheathes and bracts.

Fig. 2. Later stage of the smutted spring branches of Ph. puberula; the spore-masses on the internodes are brought in sight by the opening of the leaf-sheathes and bracts.

Fig. 3. Long branches of Ph. bambusoides *Sieb et Zucc.* smutted only on their upper portions showing that the disease occurred late in the season.

Plate XII.

Fig. 1. Germination of the spore in water observed continuously after 12–20 hours. (Zeiss F × 4).

1

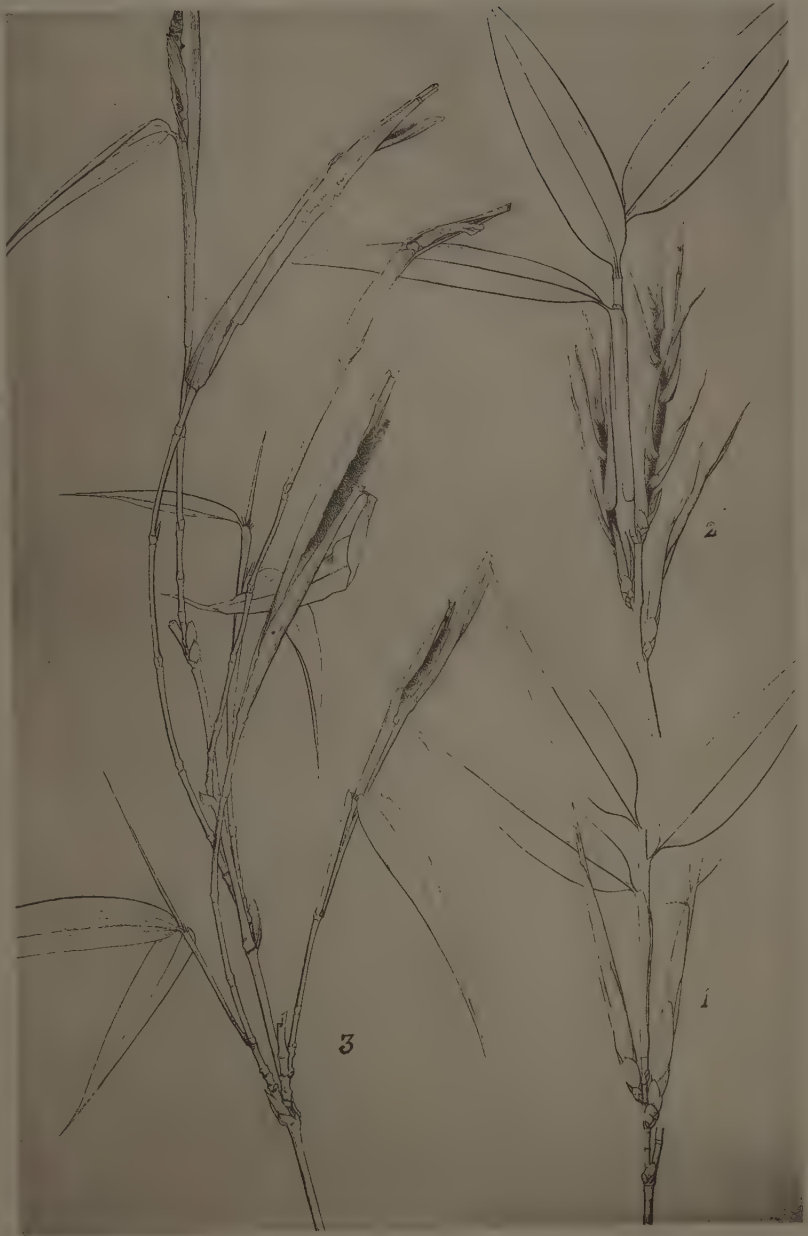
2

S. Hori Photo.

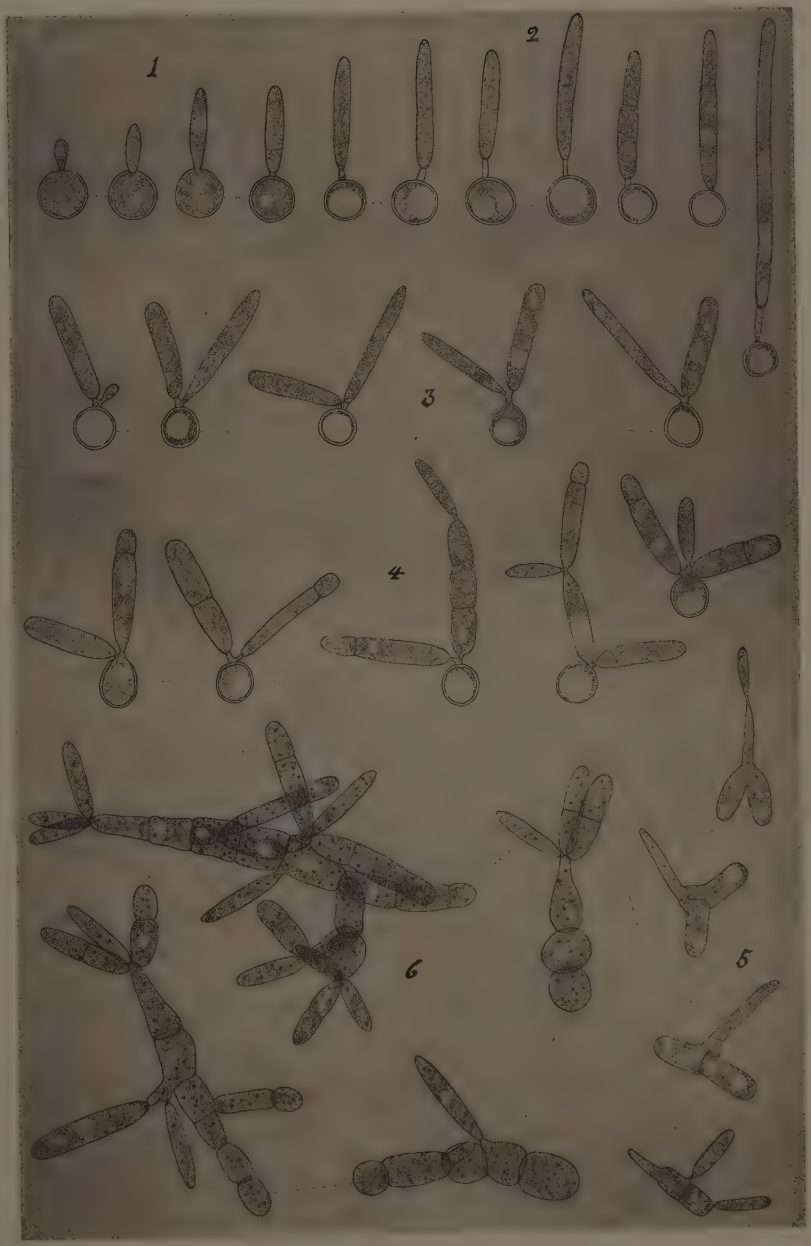
1

2

S. Hori Photo.



S. Hori del.



S. Hori del.

Fig. 2. Germination of the spores in water after 24 hours. Promycelia pedicellated and some of them are 1-septated. (Zeiss F × 4).

Fig. 3. Germinated spores in ame-solution after 24 hours. Secondary promycelia produced are still attached. (Zeiss F × 4).

Fig. 4. Same culture as above after 48 hours. (Zeiss F × 4).

Fig. 5. Detached promycelia in ame-solution produced the sporidia directly or by the knee-joint fusion after 48 hours. (Zeiss F × 4).

Fig. 6. Detached promycelia cultured in the fresh ame-solution observed after 4 days.

On a Crane Fly (Tipula parva ?).

(*Ine-no-Kiriuzi.*)

BY

S. ONUKI.

Introduction :—Larvae of the Tipula or Crane-flies often cause considerable damage to pastures and farm crops in England and other European countries. They live generally in hedges and weedy banks and are also found among rotten vegetable matter, root of grasses and other garden and farm crops. The most favorable places for this insect are however damp meadows and marshes.

In Japan, a species of crane-fly, Tipula parva (?) which I inted to describe in the following lines, is most widely spread and represents one of the worst pests of the rice plants, especially when the latter are still in the seed bed. In the spring the larvae destroy rice seedlings in the bed, by burrowing in the soil and gnawing the young plants or attacking the grains, before germination. In some parts of this country, very often sixty to ninety per cents of the seedlings are thus destroyed. They are, however, not only injurious to the rice crop, but also, to some extent, to wheat and barley in the fall, by eating through the stalk, just beneath the surface of the soil.

On account of the peculiarity of their habits and of the structure of the larvae, they can well resist insecticides and different climatical influences. Hence attempts to exterminate them are often rendered futile.

Life history :—There are two generations in one year. The adult flies of the first brood appear about in April. The females lay their eggs within a week on the wet ground. The eggs hatch in two weeks, and the larvae feed upon young rice plants and decaying organic matter in the seed bed. The larvae are changed into pupae in the month of August, and finally the adult insects appear in September. This is the adult of the second brood. As in the first, the females soon lay eggs, and the larvae which hatch from

the eggs feed upon roots of the winter crops—wheat and barley, and damage them. The offspring of the fall-flies remain in the larval stage through the winter and become adults in the following April.

In April 1st 1903, I collected a large number of full grown larvae from the experimental field of our station, and kept them in our insectory to study the life history. The result is as follow :

1903 April 1.	Full grown larva.	
„ „ 4.	Pupated.	
„ „ 17.	Adults emerged.	Pupal stage 14 days.
„ „ 19.	Femaleslaid eggs.	
„ May 1.	Larvae hatched.	Egg stage 12 days.
„ Aug. 25.	Pupated.	Larval stage 116 days.
„ Sep. 3.	Adults emerged.	Pupal stage 9 days.
„ „ 5.	Females laid eggs.	
„ „ 11.	Larvae hatched.	Egg stage 6 days.
1904 April 4.	Puparted.	Larval stage 235 days.
„ „ 14.	Adults emerged.	Pupal stage 10 days.
„ „ 17.	Females laid eggs.	
„ „ 29.	Larvae hatched.	Egg stage 12 days.

The adult insect appear mostly in the morning, between 8 and 10 o'clock. The flies come out from the T shaped splitting in the dorsal part of the pupae, and keep themselves quiet for a short time, in order to dry their wings and harden their limbs, before they take flight. In the field the development is not so regular and the adult insects are seen throughout the whole spring and in the first part of the summer, although they are most abundantly found in April. In the field the larvae of different stages are seen almost at any time, hence it is very difficult to state in which generation they belong.

Description :—

Adult : ♀ length 20 mm., expansion of the wings 43 mm., ♂ length 17 mm., expansion of the wings 41 mm. Large, slender fly with very long,

slender legs. General color pale brown. Head spherical, face produced, snout-like. Eyes round and black, separated by a broad front. Ocelli wanting, antennae long, thread-like, composed of thirteen segments, flagellum in form; first three segments pale brown, while other dark brown; second segments shortest, first and third segments large and longest, other subequal; first, second and third segments bear many short bristly hairs, while others with few short bristly hairs at the base. Proboscis elongated; palpi, almost as long as the length of antenna; bear many short hairs; composed of four segments; the basal segment shortest, the second and third segments almost twice as long as the first, fourth segment longest; larger than other three segments together. Thorax convex; metanotum with distinct suture of V shape, dark brown color; prescutum with seven dark brown straight lines; scutellum small and semicircular. Abdomen cylindrical, ten segmented; dorsal aspect yellowish brown, with darkish brown toward lateral aspect; in the female, the ovipositor with two pairs of long, horney, pointed valves. Wings long, but comparatively narrow; when rest lying not paralled over the abdomen; brownish color, costal region and stigmate dark brown; balancers very large. Legs very slender, about $1\frac{1}{2}-2$ times as long as whole length of the body; dark brown in color.

Egg: Length about 1 mm.; shiny black; elliptical in outline and flat. A long, slender, thread-like appendage at one extremity and with a small conical projection at the lateral side of other extremity.

Larva: Length about 26 mm.; greatest diameter about 4 mm.; cylindric; dusky brown. Head small, retructed; two strong chitinous plates which correspond to mandibles of other insects are well formed, bear many fine teeth. Antennae small, composed of three segments, third segment shortest. On the dorsal aspect of the body with four rows of longitudinal black doty lines; ventral aspect with a pair of black spots on each segment, excepting last three segments. Abdomen is without any tubercles, spines or hairs. Anal prominence pale yellowish, bearing at its sides three pairs of similar equal appendages which are blunt at the apex. The respiratory disk bears three pairs of marginal lobes and, between the base of the lowermost and the anal prominence, a conspicuous, setigerous tubercle. The six

marginal lobes are short and blunt at the apex, two pairs of them with a black line extends up the posterior face.

Pupa: Length about 23 mm., horns about 1.5 mm., diameter about 4 mm at thorax; dark brown in color, more or less darking toward sides. Head and face directed ventrally. The hypertrophied and functionless respiratory horns are large and rather stout, slightly enlarged at the apex. Antennae curve dorsally around the eyes and knees reaching to about one third of the whole length of the wings. Legs laid flat against the ventral surface, tips of the tarsi all ending near the apex of the fourth abdominal segment. Wing tips reaching to third abdominal segment. Abdomen with parallel sides, as far as the eighth segment. The apical carina on each segment is fringed with short, stiff hairs. The rudiments of the discal processes and the atrophied spiracles are distinctly seen on the dorsum of the eighth segment.

Notes on Treatment:—The experiments made in the laboratory as well as on a large rice field and seed bed show that larvae can not exist in water for a long time.

The writer had in the past year the opportunity of destorying the larvae in Saitama-ken, where they appeared in enormous number and made a great damage in the seed bed. In order to destroy the insects the water was allowed to flow in the seed-beds to the depth of two inches and kept for 6 to 36 hours according to the size of the seed-beds. A careful observation showed that nearly all of the larvae came out from the bed to the dikes. In order to prevent the larvae from creeping back again to the seed bed a ditch of about one foot in depth and width was dug in the seed bed along the dike and the water was allowed to flow into it. The larvae were then collected and destroyed.

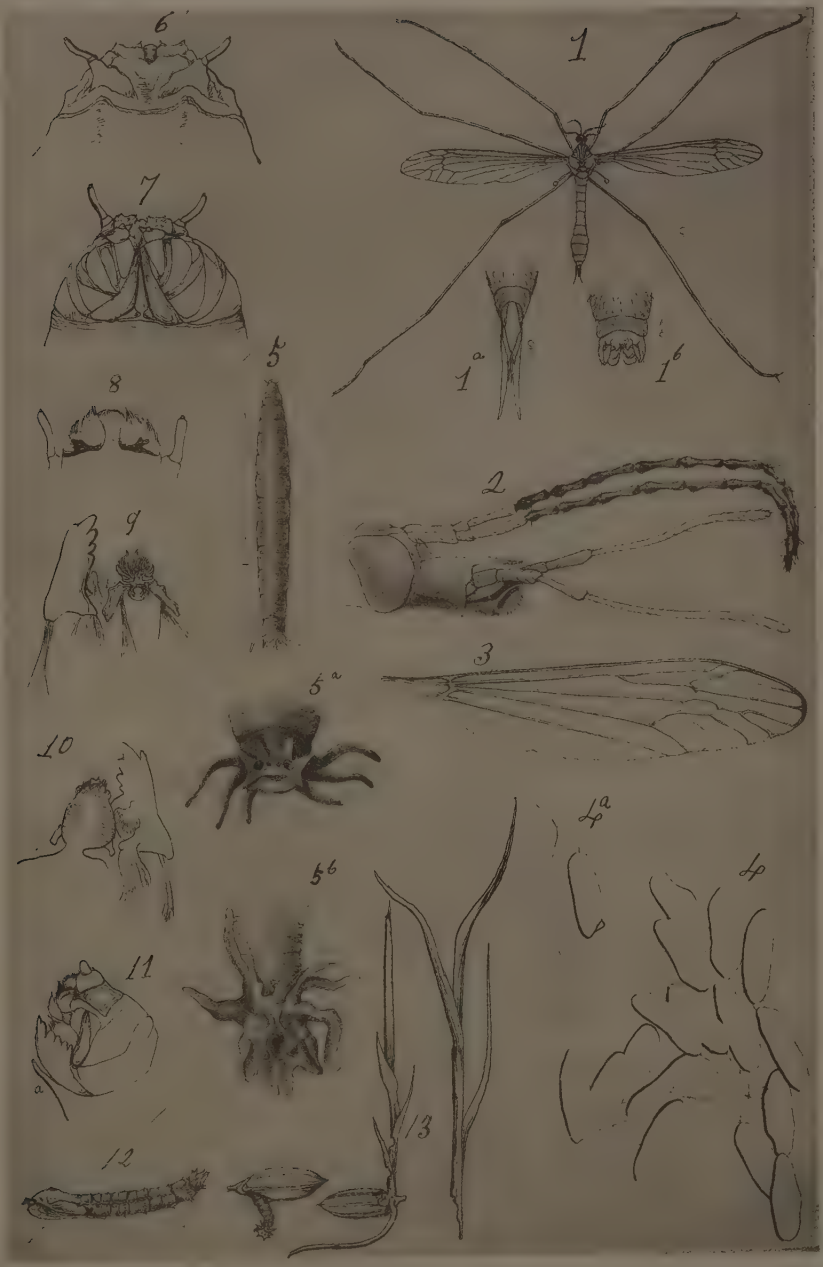
This method is the easiest and cheapest, yet very effective.

Some experiments with kerosene emulsion and Pyrethrum powder were also made, but with the former the young plants themselves suffered, while with the latter, the insects were not seriously affected.

Besides a deep plowing of the soil in winter also the catching of the adult insects with lanterns should not be neglected.

EXPLANATION OF PLATE XIII.

Fig. 1. Imago (♀) (Tipula parva Loew ?).
Fig. 1[a]. Abdominal extremities of the female.
Fig. 1[b]. „ „ „ of the male.
Fig. 2. Head (showing antennae and pulpi)
Fig. 3. Wing (showing venation).
Fig. 4. Egg cluster.
Fig. 4[a]. Egg.
Fig. 5. Larva.
Fig. 5.[a]. Abdominal extremities of the larva (dorsal view)
Fig. 5[b]. „ „ „ „ „ (ventral view).
Fig. 6. Head of larva (dorsal view)
Fig. 7. „ „ „ (ventral view).
Fig. 8. Labrum.
Fig. 9. Mandibles (showing pharynx ; frontal view).
Fig. 10. „ („ „ back view).
Fig. 11. Maxilly and labium (a. labium), right side.
Fig. 12. Pupa.
Fig. 13. Damaged rice plants.


6
1
7
1a
1b
5
8
2
9
3
5a
10
4a
4
5b
11
13
12

明治三十九年六月十五日印刷
明治三十九年六月十八日發行

農事試驗場

印刷者　東京市日本橋區兜町二番地　金澤求也

印刷所　東京市日本橋區兜町二番地　東京印刷株式會社